



DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

**ACCIONES OSTEOGÉNICAS DEL FRAGMENTO
C-TERMINAL DE LA PROTEÍNA RELACIONADA
CON LA PARATHORMONA (PTHrP) EN LA
REGENERACIÓN ÓSEA**

TESIS DOCTORAL

Daniel Lozano Borregón
Licenciado en Biología

Directores:
Pedro Esbrit Argüelles
Enrique Gómez Barrena

**LABORATORIO DE METABOLISMO MINERAL Y ÓSEO
FUNDACIÓN JIMENEZ DÍAZ (GRUPO CAPIO)
Y UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (UAM)**

El **Dr. Pedro Esbrit Argüelles**, Jefe Asociado del Laboratorio de Metabolismo Mineral y Óseo de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid y el **Dr. Enrique Gómez Barrena**, Prof. Titular de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Dpto. de Cirugía de la Facultad de Medicina U.A.M.

INFORMAN:

Que **D. Daniel Lozano Borregón**, Licenciado en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos de investigación correspondientes a la tesis doctoral: **“Acciones osteogénicas del fragmento C-terminal de la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) en la regeneración ósea”**.

Revisado el presente trabajo, estiman que se corresponde fielmente a los resultados obtenidos y quedan conformes con su presentación para ser juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firman el presente en Madrid, a cinco de mayo de dos mil diez.

Dr. Pedro Esbrit Argüelles

Dr. Enrique Gomez Barrena

Esta Tesis doctoral ha sido realizada en el Laboratorio de Metabolismo Mineral y Óseo de la Fundación Jiménez Díaz-UAM, dirigida por los doctores Pedro Esbrit Argüelles y Enrique Gómez Barrena.

Los estudios de esta Tesis doctoral han sido posibles gracias al apoyo de las siguientes Instituciones Académicas: Fundación Conchita Rábago, Grupo de Excelencia de la Comunidad de Madrid (S0505/MAT0324), Fundación Médica Mutua Madrileña (30749/001 y 5037/001) y el Instituto de Salud Carlos III (PI050117, PI080922 y RETICEF RD06/0013/1002).

Resumen

La comprensión de los mecanismos de regeneración ósea es fundamental para plantear estrategias que promuevan la regeneración ósea tras el implante de una prótesis o durante la recuperación de una fractura. Los modelos experimentales de regeneración ósea y de osteoinducción/osteointegración con biomateriales son importantes por su capacidad de transferencia a la práctica clínica. La proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) es un factor regulador clave en el remodelado óseo y la formación ósea. En la presente Tesis doctoral, se han caracterizado las propiedades osteogénicas del fragmento C-terminal de la PTHrP (107-139) y su capacidad para promover la formación y la regeneración ósea en situación de osteopenia con bajo remodelado óseo (ratones diabéticos tipo 1) y en la reparación de un defecto óseo (en fémur de conejo). Los ratones diabéticos mostraron un retardo en la regeneración ósea tras la ablación medular, asociado a una disminución de osteoblastos, osteoclastos, osteocitos y vasos sanguíneos, y a un incremento en el número de adipocitos. En este modelo, se observó una pérdida de estructura ósea en el fémur intacto. *In vitro*, en células osteoblásticas de diferente grado de diferenciación la glucosa elevada (25 mM) indujo una disminución de la función osteoblástica. Estos efectos deletéreos *in vivo* e *in vitro* fueron revertidos, al menos en parte, por las acciones inducidas por el fragmento C-terminal de la PTHrP, de modo similar a las del fragmento N-terminal homólogo con la PTH. Por otro lado, en esta Tesis se han evaluado las propiedades osteogénicas conferidas por el péptido PTHrP (107-111) (osteostatina) en cultivos de células osteoblásticas. Además, el implante de dichos biomateriales con el péptido adsorbido en un modelo de defecto cavitario en el fémur del conejo permitió caracterizar su acción promotora de la formación y la reparación ósea. En conclusión, estos hallazgos demuestran los efectos osteogénicos del fragmento C-terminal de la PTHrP tanto *in vivo* como *in vitro*, y sugieren su utilización como posible agente terapéutico para promover la regeneración ósea y revertir la pérdida de masa y estructura óseas en la osteoporosis.

Abstract

Understanding the mechanisms of bone regeneration is of utmost importance to address the recovery of bone integrity following fracture. The experimental models of bone regeneration and osteoinduction/osteointegration with biomaterials are important in this regard from a translational perspective. Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) is an important modulator of bone remodelling and bone formation. In this Doctoral Thesis, we assessed the ability of the C-terminal fragment of PTHrP (107-139) to promote the bone formation and regeneration in a mouse model of diabetic low-turnover osteopenia and a bone cavitary defect in the rabbit's femur. Diabetic mice showed retardation of bone regeneration after marrow ablation; this was related to decreased osteoblasts, osteoclasts, osteocytes and blood vessels, and increased marrow adiposity. In this model, we also observed an altered bone structure in the intact femur. Moreover, we observed a decreased osteoblast function in different types of osteoblastic cells *in vitro* in the presence of high glucose (25 mM). These effects were reversed in part by the C-terminal PTHrP fragment, or by the N-terminal PTH-like fragment of this protein. On the other hand, in this Thesis we analyzed the osteogenic effects of PTHrP (107-111) (osteostatin) in osteoblastic cells. We also evaluated the capacity of bioceramics loaded with this peptide to repair a bone cavitary defect in the rabbit's femur. In conclusion, these novel findings demonstrate the osteogenic features of C-terminal fragment of PTHrP *in vivo* and *in vitro*, and suggest that it could be envisioned as a putative therapy to promote bone regeneration and reverse the alterations in bone mass and structure in osteoporosis.

Abreviaturas

μCT	Microtomografía computerizada
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	Ácido desoxiribonucleico complementario
AG	Alta glucosa
AGEs	Productos finales de glicosilación avanzada
AMPc	3',5'- fosfato de adenosina cíclico
aP-2	Proteína de unión de ácidos grasos 2
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
TCP	Fosfato tricálcico
B.Ar	Área de hueso cortical
BMPs	Proteínas morfogenéticas del hueso
BS	Superficie ósea
BV/TV	% de volumen óseo
Cat k	Catepsina k
CMO	Contenido mineral óseo
CMMO	Células mesenquimales de la médula ósea
Ct.Th	Espesor cortical
CTR	Receptor de calcitonina
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DA	Grado de anisotropía
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DCaS	Sulfato de calcio denso
DKK1	Homólogo 1 de Dickkopf
DMEM	Medio esencial de Dulbecco modificado
DMO	Densidad mineral ósea
DXA	Absorciometría de rayos X de energía dual
EEM	Error estándar de la media
FA	Fosfatasa alcalina
FDA	Food and Drug Administration
GCs	Glucocorticoides
GLP	Péptido similar al glucagón
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
IRS	Substratos del receptor de insulina

Km	Constante de Michaelis-Menten
LRP 5	Proteína 5 relacionada con el receptor de las lipoproteínas de baja densidad
NLS	Secuencias de localización nuclear
NF-κB	Factor nuclear kappa B
MAPKs	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MMI	Momento medio de inercia
MSCs	Células madre mesenquimales
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
OC	Osteocalcina
OPG	Osteoprotegerina
OSX	Osterix
PGs	Prostaglandinas
Po	Porosidad
PPAR	Receptor activador de la proliferación de peroxisomas
PTH	Parathormona
PTHr1	Receptor de PTH/PTHrP tipo 1
PTHrP	Proteína relacionada con la parathormona
RANK	Receptor activador de NF-κB
RANKL	Ligando del receptor activador de NF-κB
RT-PCR	Transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa
Runx2	Factor de transcripción 2 relacionado con RUNT
SBA-15	<i>Santa Barbara Amorphous-15</i>
SERMs	Moduladores selectivos de receptores de estrógenos
SFB	Suero fetal bovino
SFRP	Proteínas secretadas relacionadas con frizzled
SMI	Índice de estructura del modelo
SOST	Gen de la esclerostina
STZ	Estreptozotocina
T/A	Temperatura ambiental
Tb.N	Número de trabéculas
Tb.Pf	Factor de patrón de hueso trabecular
Tb.Th	Espesor trabecular
TGF	Factor de crecimiento transformante
TRAP	Fosfatasa acida tartrato resistente
TSF	Tampón salino fosfatado
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP nick end labeling</i>

VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGFR-1	Receptor del VEGF tipo 1
VEGFR-2	Receptor del VEGF tipo 2
Wnt	Proteínas <i>wingless-type</i>

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Metabolismo óseo.....	1
1.1.1 El hueso.....	1
1.1.2 Formación ósea.....	2
1.1.3 Remodelado óseo.....	4
1.1.3.1 Regulación endocrina del metabolismo óseo.....	6
1.1.3.2 Regulación mecánica del metabolismo óseo.....	7
1.1.3.3 Otros factores locales en la regulación del remodelado óseo.....	9
1.1.3.4 La comunicación local en el remodelado óseo.....	10
1.1.3.4.1 Activación de la resorción ósea: los osteoblastos median la regulación de la osteoclastogénesis.....	10
1.1.3.4.2 La fase reversa.....	11
1.1.3.4.3 Formación ósea.....	12
1.1.3.4.4 Terminación del ciclo de remodelado: papel de la esclerostina.....	12
1.1.4 Papel de la PTHrP en el hueso.....	13
1.2 Osteoporosis.....	16
1.2.1 Osteoporosis secundaria a la diabetes <i>mellitus</i> (DM).....	17
1.2.1.1 DM y su influencia en el hueso.....	18
1.2.1.2 Factores implicados en la pérdida de masa ósea asociada a DM.....	19
1.2.2 Tratamiento farmacológicos de la osteoporosis.....	22
1.2.2.1 Estrógenos y moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERMs).....	22
1.2.2.2 Bifosfonatos.....	22
1.2.2.3 PTH.....	23
1.2.2.4 Terapias relacionadas con factores implicados en la vía Wnt.....	24
1.2.3 La PTHrP como posible agente osteogénico en la osteoporosis.....	24
1.3 Regeneración ósea y biomateriales.....	25
1.3.1 La regeneración ósea.....	25
1.3.1.1 Modelos de regeneración ósea.....	27
1.3.1.1.1 Modelo de regeneración ósea por ablación medular.....	27
1.3.1.1.2 Modelo de defecto cavitario.....	28
1.3.2 Biomateriales.....	28

1.3.2.1 Materiales mesoporosos.....	30
1.3.2.1.1 SBA-15.....	31
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	33
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
3.1 Modelos experimentales.....	34
3.1.1 Modelos experimentales <i>in vivo</i>	34
3.1.1.1 Modelo de regeneración ósea en ratón con bajo remodelado óseo asociado a DM tipo 1.....	34
3.1.1.2 Modelo de regeneración ósea tras implante en un defecto cavitario en el fémur del conejo.....	37
3.1.1.2.1 Preparación de los materiales.....	37
3.1.1.2.2 Producción del defecto cavitario en conejo.....	37
3.1.2 Modelos experimentales <i>in vitro</i>	38
3.1.2.1 Cultivo de células mesenquimales de ratón.....	38
3.1.2.2 Cultivo de células osteoblásticas MC3T3-E1 de ratón.....	39
3.1.2.3 Bioactividad in vitro de la PTHrP (107-111) cargada en biomateriales.....	39
3.2 Técnicas experimentales.....	40
3.2.1 <i>In vivo</i>	40
3.2.1.1 DXA.....	40
3.2.1.2 μ CT.....	40
3.2.1.3 Histología.....	43
3.2.1.3.1 Hueso de nueva formación.....	44
3.2.1.3.2 Osteoblastos y adipocitos.....	44
3.2.1.3.3 Vasos sanguíneos.....	44
3.2.1.3.4 Inmunohistoquímica.....	44
3.2.1.3.5 Apoptosis.....	46
3.2.2 <i>Ex vivo e in vitro</i>	47
3.2.2.1 Proliferación y viabilidad celular.....	47
3.2.2.2 Actividad de FA.....	47
3.2.2.3 Mineralización.....	48
3.2.2.4 Adipogénesis.....	48
3.2.2.5 Síntesis de colágeno.....	48
3.2.2.6 Extracción de proteína para transferencia <i>Western</i>	49

3.2.2.7 Aislamiento de ARN total y PCR cuantitativa a tiempo real.....	49
3.2.3 Análisis estadístico.....	50
4. RESULTADOS.....	51
4.1 Efecto de la PTHrP (107-139) en un modelo de regeneración ósea en ratón con bajo remodelado óseo asociado a DM tipo 1.....	51
4.2 Efecto de la PTHrP (107-139) en células osteoblásticas de diferente grado de diferenciación en medio de alta glucosa.....	60
4.3 Efecto de la PTHrP (107-111) cargada en biocerámicas en células MC3T3-E1.....	67
4.4 Efecto de la PTHrP (107-111) cargada en biocerámicas en un modelo de regeneración ósea tras un defecto cavitario en el fémur del conejo.....	72
5. DISCUSIÓN.....	81
5.1 Efecto de la PTHrP (107-139) en un modelo de regeneración ósea en ratón con bajo remodelado óseo asociado a DM tipo 1.....	81
5.2 Efecto de la PTHrP (107-139) en células osteoblásticas de diferente grado de diferenciación en medio de alta glucosa.....	83
5.3 Efecto de la PTHrP (107-111) cargada en biocerámicas en un modelo de regeneración ósea tras un defecto cavitario en el fémur del conejo <i>in vivo</i> y en células MC3T3-E1 <i>in vitro</i>	86
6. CONCLUSIONES.....	90
7. REFERENCIAS.....	91
8. ANEXO.....	127
8.1 Artículos publicados.....	127
8.2 Premios y becas.....	128
8.3 Otros méritos.....	129
8.4 Congresos internacionales.....	129
8.5 Congresos nacionales.....	132

1. Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Metabolismo óseo

1.1.1 El hueso

El hueso es un tejido conjuntivo especializado que, junto con el cartílago, forma el sistema esquelético, el cual desempeña tres funciones: 1) mecánica, como apoyo y lugar de las inserciones musculares para la locomoción; 2) protectora para los órganos vitales y la médula ósea; y 3) metabólica, como reserva de iones, especialmente fosfato y calcio, para el mantenimiento de la homeostasis, imprescindible para la vida. El hueso se compone de una matriz extracelular capaz de mineralizarse y de células especializadas (1).

El principal componente orgánico de la matriz ósea es el colágeno tipo I (90% de las proteínas totales). Además, en dicha matriz existen proteínas no colágenas con importantes funciones metabólicas, como la osteocalcina (OC, un marcador de maduración osteoblástica) y la osteopontina. La matriz ósea contiene abundantes sales minerales en forma cristalizada, en particular la hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ y, en menor medida, carbonato cálcico además de sulfatos, fluoruros e hidróxido de magnesio (2). Por la disposición espacial de los cristales y fibras de colágeno distinguimos dos tipos de hueso: lamelar y no lamelar. El hueso lamelar está constituido por unidades de seis fibras antiparalelas de colágeno mineralizado y presenta gran resistencia mecánica, mientras que en el hueso no lamelar las fibras de colágeno están menos organizadas (3). Cuando existe un daño en el tejido óseo, éste se repara en primer lugar con tejido no lamelar que posteriormente será sustituido por tejido lamelar.

Las estirpes celulares presentes en el hueso son:

- **Osteoclastos:** Células multinucleadas procedentes de precursores del linaje monocito-macrófago. Son células que resorben hueso (tanto su matriz como el mineral). La microscopia electrónica pone de manifiesto su forma irregular, un citoplasma acidófilo, una zona perimetral estriada de unión al hueso y la tinción positiva para la fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP) (Figura 1).

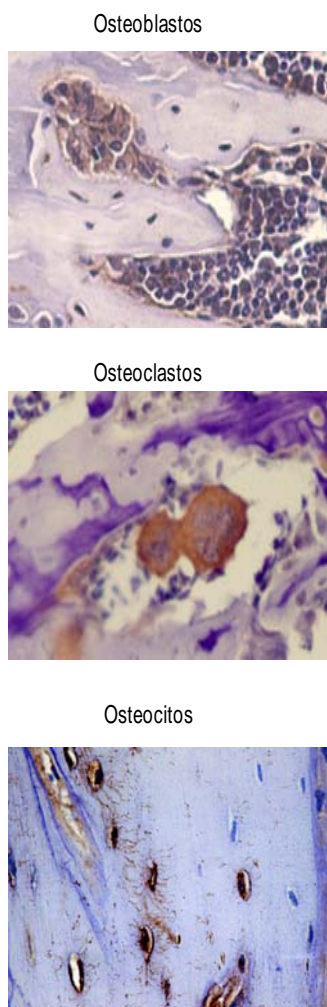
- **Osteoblastos:** Células de origen mesenquimal sintetizadoras de proteínas de matriz en las zonas de resorción, principalmente colágeno tipo I y fosfatasa alcalina (FA, enzima implicada en la mineralización), además de una gran variedad de factores de crecimiento y citoquinas que se acumulan en la matriz. Cuando no son metabólicamente activos, permanecen asociados a la superficie ósea como células de revestimiento (Figura 1).
- **Osteocitos:** Células especializadas de la línea osteoblástica organizadas en el interior de lagunas pequeñas en la matriz mineralizada (Figura 1). Sus prolongaciones citoplasmáticas se extienden a través de una fina red de canaliculos estrechos que forman una red interconectada por uniones intercelulares *GAP* o en hendidura que se distribuye por la superficie ósea. Estas células diferenciadas producen la esclerostina, proteína implicada en la regulación del remodelado óseo (ver más adelante).

Existen dos tipos principales de hueso: cortical o compacto y trabecular o esponjoso (Figura 1B). Ambos tipos están compuestos de las mismas células y los mismos elementos de la matriz, pero presentan diferencias estructurales y funcionales. La principal diferencia estructural es cuantitativa: el 80-90 % del volumen del hueso cortical está calcificado, mientras que sólo lo está el 15-25 % del hueso trabecular (el resto está ocupado por médula ósea, vasos sanguíneos y tejido conjuntivo) (2). El hueso cortical desempeña una función mecánica y protectora, mientras el hueso trabecular ejerce funciones metabólicas.

1.1.2 Formación ósea

Existen dos tipos de procesos implicados en el crecimiento y desarrollo óseos: La osificación intramembranosa (huesos planos) y la osificación endocondral (huesos largos). Aunque en los huesos largos se dan ambos procesos. Durante la osificación intramembranosa, las células mesenquimales, bajo la influencia de factores de crecimiento locales, se condensan en una zona vascularizada del tejido conjuntivo embrionario, proliferando y diferenciándose directamente a pre-osteoblastos y osteoblastos.

A



B

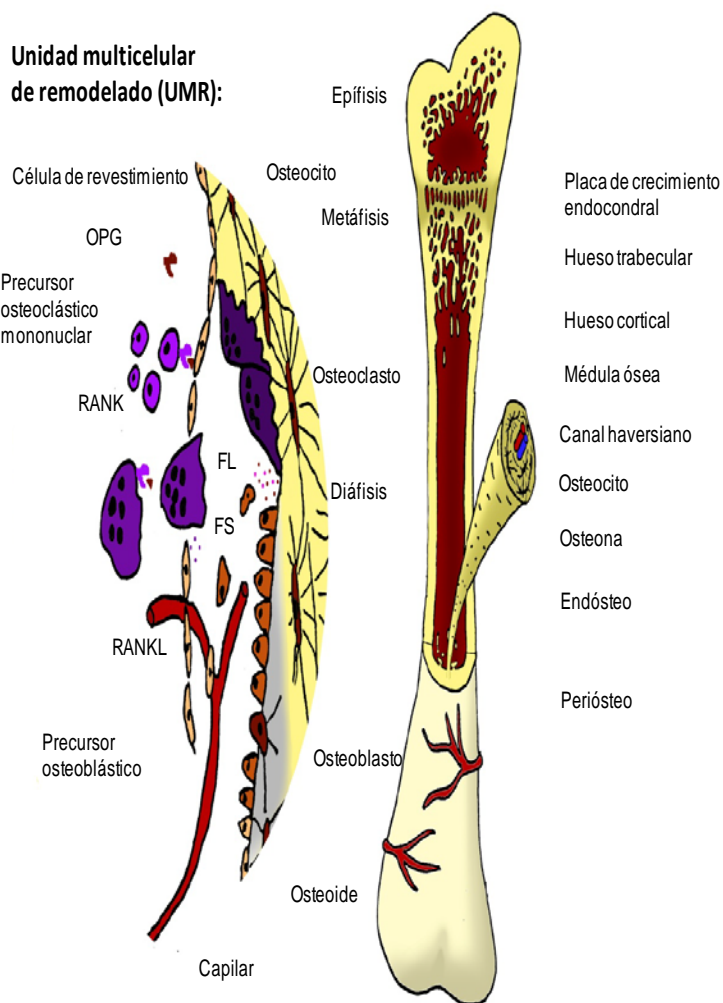


Figura 1. (A) Imágenes representativas de osteoblastos (tinción de β -catenina), osteoclastos (tinción de fosfatasa ácida tartrato resistente) y osteocitos (tinción de esclerostina). (B) Esquema morfológico de un hueso largo. Unidad multicelular de remodelado (UMR): tipos celulares y sus estadios de diferenciación. FS: factores secretados y FL: factores liberados reguladores del remodelado óseo. OPG: osteoprotegerina; RANK: receptor activador de NF- κ B; RANKL: ligando del receptor activador de NF- κ B.

La osificación endocondral tiene lugar a partir de células mesenquimales que se diferencian y forman un cartílago avascular rudimentario. Posteriormente, y bajo la influencia del factor de crecimiento del endotelial vascular (VEGF), los vasos sanguíneos penetran en el cartílago, proporcionando el riego sanguíneo que formará la médula ósea hematopoyética. Los condrocitos hipertróficos son degradados por condroclastos, reemplazados por médula ósea y, posteriormente, por hueso mineralizado. Al ir avanzando este proceso, en las proximidades de los extremos del hueso (epífisis) se va formando una zona de cartílago proliferante, la placa de crecimiento metafisiaria. En este proceso se forman bandas de tejido cartilaginoso que sirven como molde temporal para el depósito de hueso mineralizado y facilitan su crecimiento longitudinal controlado (4,5)

La microvasculatura ósea juega un papel esencial tanto en el desarrollo como en el remodelado óseo. De hecho, durante la formación ósea, tanto intermembranosa como endocondral, tiene lugar una vascularización previa a la osteogénesis (6). Por otro lado, la pérdida de hueso trabecular relacionada con la edad o a la osteoporosis se asocia a una reducción del flujo sanguíneo en el tejido óseo. Además, en el proceso de reparación tras la fractura ósea, la formación del callo (formado por osteoblastos y condroblastos en una matriz de colágeno) depende de la adecuada vascularización de la zona de fractura (7,8)

1.1.3 Remodelado óseo

El hueso está en continuo remodelado para asegurar una correcta homeostasis mineral y mantener la integridad estructural ósea, y por lo tanto su resistencia (1,9). Los osteoclastos resorben la matriz mineralizada y los osteoblastos forman hueso nuevo en una secuencia coordinada de eventos que desarrollaremos a continuación. Diferentes sistemas de regulación, tanto sistémicos como locales, son necesarios para mantener ambos procesos en equilibrio. Alteraciones en estos sistemas reguladores pueden desequilibrar dicho balance y producir así patologías metabólicas óseas, como la osteoporosis o la osteopetrosis, que veremos más adelante.

El remodelado óseo ocurre secuencialmente, es decir, de manera cíclica como un proceso de Activación-Resorción-Formación. El proceso comienza cuando células de estirpe osteoblástica que se encuentran revistiendo la superficie mineralizada a remodelar se retraen, dejando la superficie de hueso libre para que penetren los osteoclastos en la **fase de activación**. Este proceso parece iniciarse por los osteocitos, que pueden responder a un estímulo mecánico (microfracturas o falta de carga mecánica) o a señales endocrinas que actuarían directa o indirectamente sobre los mismos o las células de revestimiento. Posteriormente, en la **fase de resorción**, se produce un reclutamiento de osteoclastos que se polarizan y asocian a la superficie mineralizada, reorganizando su citoesqueleto para formar un anillo de actina que, junto con la expresión de integrinas en la superficie celular, les permitirá adherirse a la matriz ósea y formar una cámara sellada entre la membrana celular y el hueso mineralizado conocida como laguna de resorción o de Howship. La membrana plasmática de estas células desarrolla podosomas, formando un ribete en cepillo y, mediante H⁺-ATPasas, acidifican el medio de estas lagunas para solubilizar los cristales de hidroxapatita. Paralelamente, secretan a la laguna TRAP, encargada de desfosforilar ciertas proteínas de la matriz, y enzimas lisosomales [metaloproteasas, catepsina K (Cat K)], que degradarán la matriz de colágeno. Mientras realizan esta

actividad, los osteoclastos se van desplazando por la superficie del hueso libre de células de revestimiento. A continuación (unos 20 días en humanos), los osteoclastos activos promueven el reclutamiento y diferenciación de precursores osteoblásticos y entran en apoptosis (**fase reversa**). Así, estas células precursoras desarrollan un programa de diferenciación celular por el cual adoptan forma cuboidal y abundante retículo endoplasmático rugoso y aparato de Golgi, polarizados hacia la zona de osteosíntesis. Esta diferenciación está regulada por diversos factores de transcripción, entre los que destacan el factor de transcripción 2 relacionado con RUNT (Runx2) y osterix (OSX), marcadores tempranos de diferenciación osteoblástica. Durante la **fase de formación**, tiene lugar primero la síntesis de osteoide, constituido en su mayor parte por una matriz de colágeno tipo I, en un proceso relativamente rápido (unos 11 días en humanos), seguido de una fase de mineralización más lenta mediada por la FA que hidroliza fosfato orgánico dando lugar a fosfato inorgánico, necesario para la mineralización de la matriz. El proceso de remodelado óseo dura 2-3 meses en humanos. Al final, el 10-30% de los osteoblastos quedarán atrapados en la matriz mineralizada formando los osteocitos (10), otros quedarán sobre la nueva superficie ósea como células de revestimiento, mientras que la mayoría entrará en apoptosis.

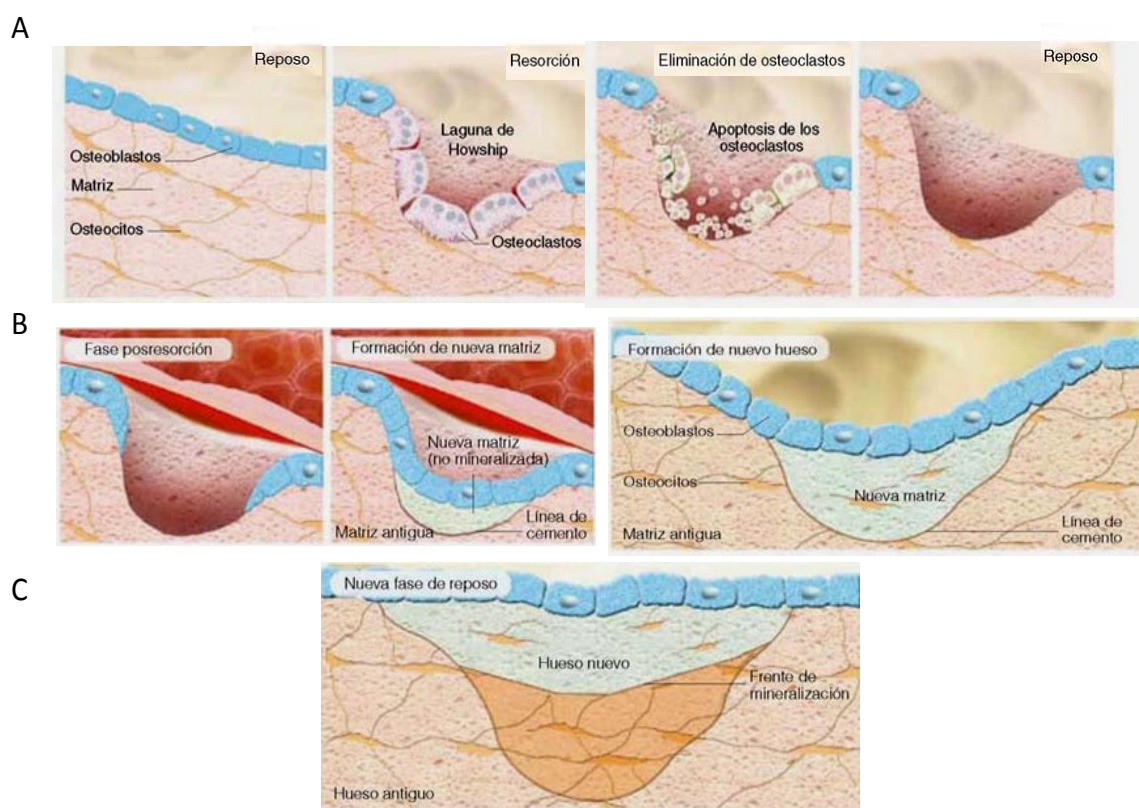


Figura 2. Resumen del proceso de remodelado óseo. (A) Fases de reposo y resorción ósea. (B) Fases de postresorción y de formación ósea. (C) Fase de reposo. (Imágenes modificadas de Guyton AC. Tratado de Fisiología médica. 11ª Ed. Interamericana, México, 2006).

En el hueso maduro sano, el balance del remodelado (la diferencia entre el hueso formado y eliminado) es neutro. La mayoría de las patologías metabólicas óseas tienen como resultado un balance de remodelado óseo negativo (como la osteoporosis y la osteomalacia), mientras que son menos comunes las patologías asociadas a un balance de remodelado positivo [como la osteopetrosis y la enfermedad de Van Buchem (11)].

1.1.3.1 Regulación endocrina del metabolismo óseo

La parthormona (PTH) es una hormona esencial en el mantenimiento de la homeostasis fosfocálcica. El papel atribuido tradicionalmente a esta hormona sobre el hueso es el de activar la resorción, además de estimular directamente la reabsorción tubular de calcio a nivel renal y aumentar la absorción intestinal de calcio. Si bien aumenta el número y la actividad de los osteoclastos cuando se administra de forma continua, administrada de forma intermitente tiene efectos anabólicos óseos, aumentando el remodelado con predominio de la formación, debido a una mayor actividad y supervivencia osteoblástica (12). Así, la modulación del metabolismo óseo de esta hormona es compleja, actuando directamente a través de su receptor 1 (PTHr1) sobre los osteoblastos y, según se ha descrito recientemente, sobre los osteocitos (13).

La **calcitonina** es una hormona secretada por las células parafoliculares de la glándula tiroides. Su acción sistémica es opuesta a la de la PTH. A nivel óseo, actúa directamente sobre los osteoclastos, que poseen receptores para esta hormona en su membrana celular, disminuyendo el número y actividad de los mismos (14). También se han descrito efectos antiapoptóticos en osteoblastos (15). La **1,25(OH)₂-Vit D₃** o calcitriol es el metabolito activo de la vitamina D₃ que, además de aumentar la absorción intestinal de calcio, actúa sobre la mineralización del tejido óseo, estimulando la síntesis osteoblástica de FA (16) y de OC (17) tras la unión a su receptor VDR en osteoblastos. Estos efectos son dependientes de la diferenciación osteoblástica, mostrando un descenso en diversos marcadores osteoblásticos cuando la exposición a 1,25(OH)₂-Vit D₃ se hace en estadios tempranos de diferenciación (18). Las hormonas sexuales, **estrógenos y andrógenos**, son importantes tanto para la maduración del esqueleto en desarrollo como en su mantenimiento en adultos; previniendo de la pérdida de masa ósea asociada a la edad e inhibiendo la resorción ósea. Se ha demostrado que tanto los osteoclastos como los osteoblastos presentan receptores nucleares para estrógenos y receptores citosólicos para andrógenos (19,20), por lo que sus efectos antirresortivos podrían ser directos, o bien indirectos, mediados por los osteoblastos, a los que protege de la apoptosis (21-23).

La administración oral de **glucocorticoides (GCs)** se asocia a un aumento del riesgo de fractura de columna y cadera (24) y a una disminución de la densidad mineral ósea (DMO) (25). Los efectos catabólicos de los GCs sobre el hueso pueden ser directos sobre las células óseas, aumentando la actividad y viabilidad osteoclástica, tanto por una acción directa sobre este tipo celular (26) como por una disminución de la expresión de la osteoprotegerina (OPG) y un aumento de la expresión del ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (RANKL) por los osteoblastos (27). También puede ser indirectos, a través de la inhibición de la absorción intestinal de calcio y el aumento de su excreción renal, disminuyendo la secreción de hormonas sexuales (28) y originando un deterioro de la masa muscular, lo que conlleva a la pérdida de su efecto trófico sobre el hueso y a un incremento en la inestabilidad y riesgo de caídas (25, 29, 30).

La **insulina** produce un aumento directo de la formación ósea, al estimular la síntesis de proteínas de la matriz ósea y favorecer su mineralización. A nivel celular, se han detectado receptores para insulina (IR) en osteoblastos (31), que señalizan a través de los substratos del receptor de insulina (IRS) específicos IRS-1 y IRS-2. Al parecer, el IRS-2 mantiene la dominancia de la formación ósea sobre la resorción, mientras que IR-1 regula el remodelado (32). Diversos estudios en modelos animales demuestran que la insulina estimula el metabolismo óseo independientemente de otros factores de crecimiento, hormonas o citoquinas (33). Las **hormonas tiroideas** son esenciales para el desarrollo normal del cartílago y el hueso endocondral e intramembranoso. Los efectos que la hormona triyodotironina ejerce sobre el tejido óseo son bifásicos, observándose efectos anabólicos durante el crecimiento y catabólicos en la etapa adulta. Estos efectos parecen estar mediados, al menos en parte, por el factor de crecimiento similar a insulina (IGF)-1 (34). La **leptina** es una hormona producida fundamentalmente en el tejido adiposo, con una función moduladora en el metabolismo energético, promoviendo la lipólisis y actuando como señal de saciedad. Recientemente se ha demostrado que tiene una función reguladora negativa en el hueso, al estar incrementada la masa ósea de ratones con supresión del gen de la leptina o de su receptor (35). Sin embargo, su acción es controvertida ya que se ha demostrado *in vitro* que es secretada por los osteoblastos, en los que promueve la mineralización (36).

1.1.3.2 Regulación mecánica del metabolismo óseo

El esqueleto, al ser el órgano responsable de dar soporte y protección a los demás tejidos y órganos, ha de ser un tejido adaptativo que responda a las cargas

mecánicas externas. Así, ya en 1638, Galileo documentó por vez primera la observación de que la forma de los huesos armoniza con la carga mecánica a la que son sometidos. Hoy sabemos que en ausencia de carga mecánica se pierde masa ósea, mientras que cuando existe una tensión mecánica la masa ósea se mantiene o aumenta; aunque los mecanismos de estos efectos no son totalmente conocidos (37). Además, de forma cotidiana, el hueso sufre microfracturas como consecuencia de las cargas e impactos a los que es sometido. Estas áreas microfracturadas son detectadas en el tejido óseo, en el que se inicia localmente el remodelado para su reparación.

Aunque se ha demostrado que tanto las células de revestimiento como los osteoblastos maduros y los osteocitos responden a estímulos mecánicos (38), éstos últimos -que representan el 95% del total de células óseas- parecen ser los principales reguladores de estas respuestas adaptativas del remodelado óseo, al estar interconectados en el interior del tejido óseo calcificado en el hueso cortical. Pese a esto, existen pocos datos concluyentes acerca de cómo la tensión mecánica es detectada por estas células. Una de las teorías más aceptadas es la existencia de un flujo del medio intersticial de los canalículos y lagunas en el interior del tejido óseo calcificado. Este flujo sería provocado por las cargas mecánicas detectadas por los osteocitos a través de su membrana plasmática. En cualquier caso, no está claro si los mecanosensores serían los propios cuerpos celulares de los osteocitos y sus dendritas, que detectarían el flujo por deformaciones de membrana, o los posibles elementos de anclaje entre la membrana celular y la matriz ósea, que se alterarían por este flujo y transmitirían una señal intracelular, o bien cilios presentes en la membrana osteocítica (37). De cualquier modo, tras detectar el estímulo mecánico, los osteocitos producen rápidamente factores como NO y prostaglandinas (PGs) que inhiben localmente la resorción y aumentan la formación ósea (39). En ausencia de estímulos mecánicos, los osteocitos mantienen inhibida la formación ósea mediante la secreción de factores como esclerostina y la proteína relacionada con *Dickkopf-1* (DKK1), inhibidores de las proteínas *wingless-type* (Wnt), esenciales para la diferenciación osteoblástica a través de la vía de señalización Wnt/ -catenina. Por el contrario, cuando existe una carga mecánica, la producción de estos factores se inhibe (37).

Los osteocitos podrían detectar y transmitir la presencia de una microfractura a través de su apoptosis. Así, se ha demostrado que los osteocitos afectados por una microfractura expresan Bax, proteína proapoptótica, mientras que los circundantes expresan Bcl-2, proteína antiapoptótica. De esta forma, los osteocitos dañados emitirían señales pro-resortivas, mientras que los circundantes quedarían protegidos (40). Los osteocitos pueden secretar además factores de diferenciación osteoclástica,

como el RANKL y el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), en las dendritas, por lo que podrían estimular localmente la diferenciación osteoclástica en la superficie ósea (41).

1.1.3.3 Otros factores locales en la regulación del remodelado óseo

Los efectos moduladores sobre el metabolismo óseo están además coordinados por muchos otros agentes locales, que orquestan la acción de las células óseas.

Los **IGFs** son unos de los factores de crecimiento más abundantes en el esqueleto. Se encuentran formando complejos, unidos a diversos tipos de proteínas fijadoras sintetizadas por los osteoblastos (IGFBPs) que controlan su biodisponibilidad. Sus dos isoformas, IGF-1 y IGF-2, poseen actividad anabólica, especialmente el IGF-1, cuya síntesis es regulada por la hormona del crecimiento y la PTH (42,43). El IGF-1 es secretado por los osteoclastos y los osteoblastos y regula la formación ósea, induciendo la diferenciación osteoblástica a través del factor de transcripción OSX (44).

El factor de crecimiento transformante (**TGF**)- β es un factor producido por los osteoblastos con efectos autocrinos, estimulando el reclutamiento y la proliferación y diferenciación osteoblástica. Promueve la deposición de proteínas de la matriz y la expresión de Runx2; mientras que inhibe el receptor activador de proliferación de peroxisomas (PPAR γ), un factor de diferenciación adipocítico (45). Parece promover la osteoclastogénesis *in vitro* y la resorción ósea *in vivo* aumentando su sensibilidad para RANKL (46). Las **proteínas morfogenéticas del hueso** (BMPs) son proteínas de la familia del TGF- β , producidas por los osteoblastos, en los que modulan su reclutamiento y diferenciación temprana. La BMP-2 activa la diferenciación osteoblástica a través de los factores de transcripción Runx2 y OSX (44), actuando tanto en osteoblastos como en las células mesenquimales precursoras (47).

Las **PGs**, especialmente la E₂, son también abundantes en el hueso, donde las producen los osteoblastos. Poseen efectos bifásicos tanto en la formación como en la resorción ósea, estimulando el desarrollo de osteoblastos y osteoclastos e inhibiendo a ambos tipos celulares maduros (9). Los factores de crecimiento de los fibroblastos (FGFs), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) estimulan la replicación y diferenciación de las células óseas. El VEGF es secretado por vasos sanguíneos y osteoblastos y parece tener un importante papel en la diferenciación osteoblástica del hueso en regeneración (48); mientras que el PDGF está asociado a procesos de inflamación y la

familia de los FGF afectan a la proliferación y diferenciación osteoblástica y condrocítica a través de Runx2 (49).

Las proteínas **Wnt** han cobrado recientemente un importante papel en la diferenciación osteoblástica. Wnt3a y Wnt10 parecen ser las más importantes en las células óseas donde actúan como activadores de la vía de señalización Wnt/ -catenina, y potenciando la osteoblastogénesis en detrimento de la adipogénesis de células precursoras, mediante la modulación de Runx2 y PPAR γ , respectivamente (50,51).

1.1.3.4 La comunicación local en el remodelado óseo

1.1.3.4.1 Activación del ciclo de remodelado: los osteocitos como iniciadores de la resorción ósea

La evidencia actual indica que los osteocitos son importantes reguladores del remodelado óseo. El papel más importante de estas células es responder al estrés mecánico que puede producir microfracturas, como en las patologías con alto grado de remodelado. Los osteocitos responden a este estrés entrando en apoptosis, un efecto asociado al aumento de la osteoclastogénesis y, por lo tanto, de resorción de la matriz ósea deteriorada. Parece que la pérdida de osteocitos es esencial para el reclutamiento de osteoclastos, observación que se ve reforzada por el hecho de que los osteocitos vivos secretan TGF- β , el cual inhibe la osteoclastogénesis y/o la resorción por parte de los osteoclastos. Un estudio reciente ha demostrado que los osteoclastos resorben preferentemente huesos “viejos”, que contienen menos osteocitos (52).

1.1.3.4.2 Activación de la resorción ósea: los osteoblastos regulan la osteoclastogénesis

Entre los factores locales que controlan el remodelado óseo encontramos el sistema formado por la OPG y el RANKL. Las señales procedentes del osteoblasto al osteoclasto están bien descritas; entre ellas, las más importantes son M-CSF y el RANKL (potente activador osteoclástico), esenciales y suficientes para inducir la osteoclastogénesis (53). El RANKL, una proteína de la familia del TNF- α en la membrana de los osteoblastos que puede ser secretada por estas células, se une a RANK, presente en los precursores osteoclásticos, estimulando así su diferenciación y maduración a osteoclastos (54-56). La eliminación genética del RANKL y del RANK en

ratones produce una osteopetrosis por ausencia de osteoclastos maduros. Por el contrario, la administración de RANKL en ratones sanos induce hipercalcemia y osteoporosis (54). La activación del RANKL es regulada por la OPG, que al unirse al RANKL evita su interacción con RANK. De hecho, ratones con eliminación genética del gen de la OPG poseen un aumento de osteoclastos y de resorción ósea. Estos animales mueren por complicaciones asociadas a anomalías esqueléticas y calcificaciones vasculares (54, 57).

La PTH es un importante modulador del sistema OPG/RANKL. Esta hormona induce una expresión transitoria de RANKL en los osteoblastos. La administración intermitente de la PTH induce efectos anabólicos, aumentando el ratio OPG/RANKL y por lo tanto la formación ósea, mientras que una administración continua disminuye los niveles de OPG y aumenta los de RANKL, ejerciendo una acción catabólica en el hueso (53). Diversos moduladores de la actividad osteoclástica, como la $1,25(\text{OH})_2$ vitamina D_3 , la PG E_2 y algunas citoquinas [interleuquina (IL)-1 e IL-6], actúan a través del RANKL y de forma simultánea sobre la OPG (52,55). De este modo, a través del balance OPG/RANKL, estos agentes regulan el remodelado óseo. El déficit estrogénico o androgénico incrementa esta relación, aumentando así la resorción ósea (58,59).

1.1.3.4.3 La fase reversa

- El papel de las lagunas de resorción

Inicialmente se observó que la formación ósea en adultos sanos ocurre en lagunas de resorción vacías. Posteriormente, varios estudios han señalado que los osteoblastos y sus precursores cultivados *in vitro* forman hueso mineralizado preferentemente en las lagunas de resorción (60). Por otro lado, existen otras evidencias que indican que la superficie de resorción contiene señales importantes para el reclutamiento de los osteoblastos y/o sus precursores. En este sentido, las superficies de resorción en pacientes con osteopetrosis son mayores debido al elevado número de osteoclastos presentes (53).

- Señalización bidireccional entre osteoclastos y osteoblastos

Recientemente, se ha puesto de manifiesto un mecanismo bidireccional de comunicación entre los osteoblastos y los osteoclastos. Así, la expresión de efrina-B2 en estas células conduce a la activación de la formación ósea por su unión a EphB4 en los osteoblastos; mientras que dicha unión inhibe la osteoclastogénesis (61). Esta señalización podría estar implicada en la interacción entre los osteoclastos y las

células de revestimiento, que al estar en contacto permitiría a los osteoclastos inhibir la diferenciación osteoblástica durante la fase reversa (62).

1.1.3.4.4 **Formación ósea**

La mayoría de los estudios muestran que los osteoclastos juegan un papel central en el proceso de formación ósea pero no necesariamente relacionado con su actividad resortiva en la fase reversa (53). Además del mecanismo descrito anteriormente a través del sistema efrina-B2/EphB4, los osteoclastos parecen secretar señales paracrinas para los osteoblastos o liberar factores anabólicos de la matriz en el proceso resortivo. La activación de los osteoblastos es uno de los pasos más importantes del remodelado óseo. Entre los factores locales estimuladores de la formación ósea destacan TGF- β e IGF-1, producidos por los osteoclastos y liberados durante la resorción (63). Se ha demostrado que la supresión específica del receptor de IGF-1 en los osteoblastos conduce a una osteopenia asociada a menor formación ósea. El efecto anabólico de la PTH en ratones parece estar mediado por este factor y depender de la presencia de osteoclastos, por lo que el IGF-1 podría ser un factor acoplador de osteoclastos/osteoblastos (53). Un estudio (64) demuestra que los osteoclastos humanos maduros, independientemente de su actividad resortiva, secretan factores que pueden activar la formación de nódulos de mineralización por parte de los osteoblastos

1.1.3.4.5 **Terminación del ciclo de remodelado: papel de la esclerostina**

Estudios recientes demuestran que los osteocitos pueden regular la formación ósea a través del contacto directo con otras estirpes osteoblásticas a través de uniones intercelulares. Los osteocitos producen esclerostina, un ligando de LRP5 (proteína 5 relacionada con el receptor de las lipoproteínas de baja densidad) que previene la activación de la formación ósea a través de la vía Wnt/ β -catenina (13). Su importancia radica en la observación de que la ausencia de esclerostina se asocia a la enfermedad de Van Buchem y a la esclerostosis, caracterizadas por una elevada masa ósea (53). Se sabe que tanto la PTH como la estimulación mecánica reducen la expresión de esclerostina, aumentando la formación ósea (65,66). Sin embargo, ratones deficientes en osteocitos muestran una baja tasa de formación ósea (53). Por tanto, existen evidencias suficientes para concluir que los osteocitos juegan un papel importante en la regulación tanto de la formación ósea como del remodelado óseo;

aunque aún existen incógnitas por resolver para establecer su verdadero papel en este proceso.

1.1.4. Papel de la proteína relacionada con la PTH (PTHrP) en el hueso

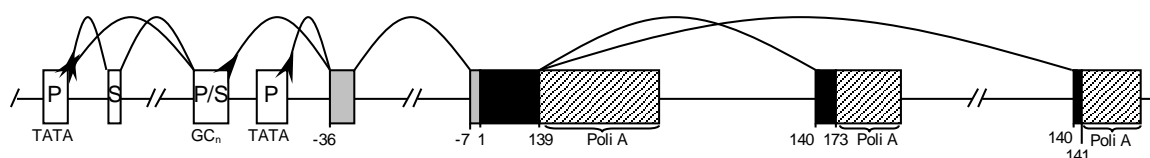
La PTHrP se identificó inicialmente por su papel patogénico en la hipercalcemia tumoral de origen humoral (67). El aislamiento y secuenciación de la PTHrP al final de la década de los 80 permitió comprobar la similitud estructural del extremo N-terminal de esta proteína con la PTH. Actualmente se sabe que la PTHrP y el receptor tipo 1 común para PTH/PTHrP (PTHr1) se expresan en una amplia variedad de tejidos, malignos y no malignos, donde la PTHrP ejerce efectos auto/paracrinós e intracrinós (68,69). En el entorno óseo, la PTHrP es sintetizada por los osteoblastos y condrocitos, y juega un papel importante en el desarrollo del hueso endocondral y como regulador del metabolismo óseo en adultos (70,71). De hecho, la supresión homocigótica del gen de la PTHrP genera una condrodisplasia letal perinatal en el ratón; mientras que los animales con supresión heterocigótica de este gen son viables pero muestran una reducción significativa de la masa ósea (71). Evolutivamente, el gen de la PTHrP proviene de un ancestro común a la PTH, con la que conserva una gran homología estructural. Ciertos autores creen que el gen original sería muy similar al de la PTHrP, y sitúan su aparición en los primeros protovertebrados del Cámbrico, hace 450-500 millones de años (72). El gen de la PTH, como hormona calciotropa producida en una glándula especializada (paratiroides), se generaría posteriormente, en los primeros anfibios, por duplicación cromosómica. Estos datos están apoyados por la similitud nucleotídica de las regiones cromosómicas que rodean a ambos genes (73) y por el hecho de que la PTHrP se ha localizado en peces teleósteos, carentes de glándula paratiroides, en los que es la principal proteína calciotropa (74).

El gen de la PTHrP humana se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 12. Contiene 8 exones y presenta, al menos, 3 promotores y un silenciador en la región 5'. Por procesamiento alternativo en el extremo 3' se generan tres tipos distintos de ARNm, que dan lugar a tres isoformas proteicas, de 139, 141 y 173 aminoácidos (67) (Fig. 3). Cada una de estas isoformas codifica una secuencia N-terminal común de 36 aminoácidos que contiene la región homóloga con la PTH (entre los aminoácidos 1-13). La conformación espacial (aunque no su secuencia) de la región 14-34 es similar en ambas proteínas, lo que permite su interacción con el PTHr1. Del aminoácido 35 al 111, la secuencia de la PTHrP está muy conservada en las distintas especies (en humanos solo difiere en dos aminoácidos respecto a la de

roedores). Como consecuencia de su procesamiento post-traducciona (75), la PTHrP puede generar: 1) un fragmento 1-36 en el extremo N-terminal; 2) un fragmento medio, cuyo extremo C-terminal podría estar entre los aminoácidos 90-100, una región rica en residuos multibásicos. Las secuencias 88-91 y 102-106 son dominios de localización nuclear/nucleolar (NLS) similares a los de ciertos factores de transcripción de mamíferos y virales; y 3) un posible fragmento C-terminal a partir del aminoácido 107 (el dominio 102-106 es sustrato de enzimas convertasas). Este fragmento posee el pentapéptido 107-111 (conocido como *osteostatina*) (Fig. 3).

Actualmente, la PTHrP se considera una proteína multifuncional capaz de ejercer una diversidad de acciones asociadas a sus diferentes fragmentos metabólicos. Sus acciones endocrinas, similares a las de la PTH, como la estimulación de la resorción ósea y la inhibición de la reabsorción renal del fosfato, se deben al **fragmento N-terminal** a través de su interacción con el PTHR1 en hueso y riñón, respectivamente (67-69,75). El PTHR1 es el único receptor clonado para la PTHrP. Este receptor pertenece a la familia de receptores con siete dominios transmembrana acoplado a proteínas G (tipo II) (76,77). La interacción del fragmento N-terminal de la PTHrP con el PTHR1 activa las vías adenilato ciclasa/proteína quinasa A (PKA) y fosfolipasa C (PLC)/PKC, a través del acoplamiento de proteínas Gs y Gq, respectivamente, en los osteoblastos y en las células renales del túbulo proximal. El determinante de la activación de AMPc/PKA reside en los 6 primeros residuos N-terminales de la PTHrP (78). La vía de activación de la PLC, con generación de trifosfato de inositol (IP3)/Ca²⁺ y/o activación de PKC, parece ser dependiente de la densidad de receptores (79-81). Ambas vías de señalización confluyen en la activación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) para modular la proliferación/diferenciación osteoblástica (82,83). Recientemente, se ha clonado un receptor, que muestra homología con el PTHR1, el PTHR2, con especificidad preferencial para la PTH frente a la PTHrP (77), expresado preferentemente en cerebro y vasos. Además, se ha sugerido la existencia de receptores distintos del PTHR1 tanto para la PTHrP (1-36) como para otros dominios de la PTHrP en varios tipos celulares (75,84-87). Estudios recientes indican que aunque la PTH y la PTHrP interaccionan con el PTHR1 a través de su extremo N-terminal, aunque el tipo de interacción y como consecuencia las vías intracelulares activadas por cada una de estas proteínas podrían ser diferentes (88). Aunque el fragmento 1-36 de la PTHrP ejerce acciones anabólicas en el hueso, estimulando fundamentalmente la formación ósea (89-92), los posibles mecanismos asociados a esta acción osteogénica son poco conocidos.

ESTRUCTURA GÉNICA



ISOFORMAS PROTEICAS

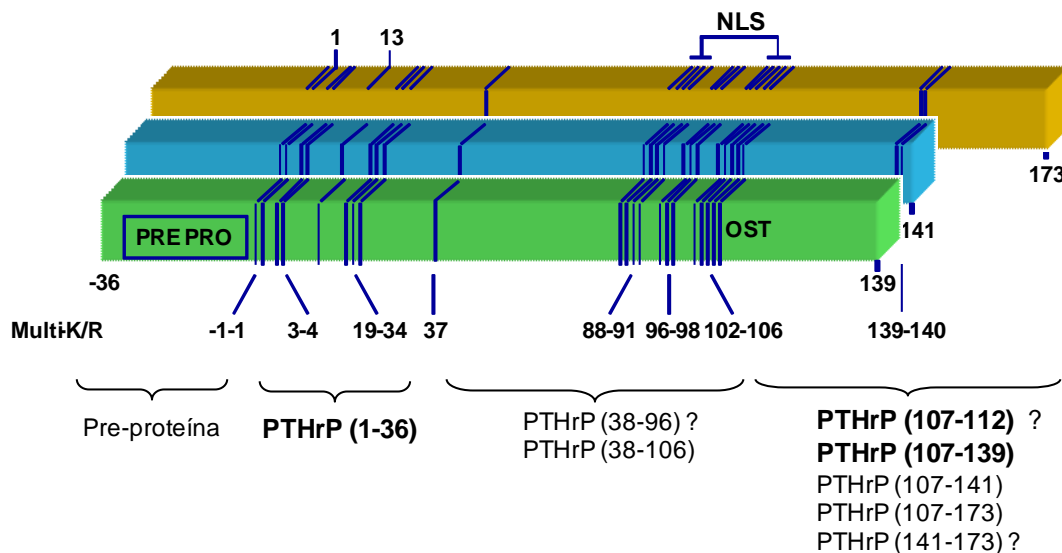


Figura 3. Esquema del gen de la PTHrP humana y su procesamiento post-traduccional. El gen de la PTHrP se encuentra en el brazo corto del cromosoma 12. Contiene 8 exones, de los cuales 4 no son transcritos, 3 promotores (P) y dos silenciadores (S). El procesamiento alternativo del gen da lugar a tres isoformas proteicas de 139, 141 ó 173 aminoácidos. Su procesamiento post-traduccional puede generar tres tipos de fragmentos, el N-terminal (1-36), homólogo a la PTH; la zona media (38-106), con secuencias de localización nuclear (NLS), que podría comprender sólo hasta el aminoácido 96 por proteólisis a través de endopeptidasas (E); y el C-terminal, que contiene la región de 5 aminoácidos 107-111, *osteostatina* (OST), que podría liberarse como el fragmento PTHrP (107-112); y una posible fragmento 141-173 en la isoforma más larga de la PTHrP.

La región media de la PTHrP, comprendida entre los aminoácidos 38 y 106, posee una función y tamaño exacto desconocidos. Esta región posee NLS entre los aminoácidos 87 y así ejerce acciones intracrininas. Se ha descrito una posible traducción alternativa de la PTHrP, a partir de codones CUG situados en la secuencia correspondiente a la pre-proteína, que liberaría a la proteína de la secuencia de enclave al retículo endoplásmico, facilitando su transporte al núcleo a través de los NLS (93,94).

En el **dominio C-terminal de la PTHrP**, los fragmentos 107-112 y 107-139, limitados por aminoácidos básicos que podrían ser reconocidos por endopeptidasas (95), son potentes inhibidores de la actividad osteoclástica (85,96-99). De hecho, el

pentapéptido 107-111 de la PTHrP, presenta una potente actividad antiresortiva *in vitro* e *in vivo* (incluso a dosis de fM), lo que llevó a denominarlo *osteostatina* (95). Se ha demostrado que este dominio C-terminal de la PTHrP también afecta a la diferenciación y supervivencia osteoblásticas, a través de la activación de la PKC (100). Aunque aún no se ha logrado aislar un receptor para esta región C-terminal de la PTHrP, estudios recientes de nuestro laboratorio han demostrado una transactivación del receptor 2 del VEGF (VEGFR-2) asociada a sus acciones sobre la función osteoblástica (84,100).

Además, se ha detectado inmunoreactividad para la región 141-173 en el carcinoma de próstata, la leche y el líquido amniótico humanos; indicando la presencia de este posible fragmento formado a partir de una de las tres isoformas de la PTHrP, cuyas acciones son aún desconocidas en parte (101), aunque se ha demostrado que protege frente a la apoptosis en el cáncer de pulmón y próstata (72,102).

1.2. Osteoporosis

El término osteoporosis indica una pérdida de masa y de calidad ósea (p.e., mayor porosidad), con el consiguiente riesgo de fracturas de columna vertebral, muñeca, cadera o costillas (103). Esta patología se considera como la “epidemia silenciosa”, ya que a menudo no existen síntomas específicos antes de que se produzca la fractura. Aproximadamente más de 200 millones de personas en el mundo (3,5 millones de personas en España) padecen esta enfermedad actualmente (104); una población que se estima crecerá durante los próximos años debido a la longevidad y a la pauta de vida. La forma más fiable de determinar la pérdida de masa ósea es medir la DMO a través de absorciometría de rayos X de energía dual (DXA). La Organización Mundial de la Salud considera a una paciente osteoporótica cuando la DMO en columna, cadera o muñeca se desvían al menos 2,5 desviaciones estándar de la media de una mujer caucásica joven y sana, y expresa como el *T-score* menor o igual a -2,5. Los valores de *T-score* entre 1 y 2,5 desviaciones estándar constituyen osteopenia (105). La osteoporosis afecta sobre todo a las mujeres postmenopáusicas (con depleción estrogénica) pero también a los varones a partir de los 50 años. Las fracturas osteoporóticas son comunes y se asocian a factores físicos, sociales y económicos (106). El número de fracturas de cadera en todo el mundo fue de cerca de 2 millones en 1990, siendo la estimación para el año 2050 de 6 millones. Este tipo de fracturas necesitan de hospitalización y son mortales en el 20% de los casos, produciendo una discapacidad permanente en aproximadamente la mitad de los pacientes. Ello ha supuesto en la Unión Europea un coste sanitario de 3500 millones

de Euros al año (107). Las principales patologías asociadas a osteoporosis se señalan en la Tabla 1.

En la osteoporosis existe una alteración del remodelado óseo debida a dos causas fundamentales, normalmente asociadas: 1) un aumento de las unidades multicelulares de remodelado óseo (UMRs) y 2) un predominio de la resorción sobre la formación ósea (108,109). El origen de la pérdida de masa ósea es multifactorial; así, se asocia a la edad y a la menopausia (osteoporosis primaria), al tratamiento prolongado con ciertos fármacos (p.e., GCs) o a otros factores de riesgo, entre los que se encuentran algunos síndromes endocrinos.

Tabla 1. Tipos de osteoporosis

A) <i>Osteoporosis primaria</i>
1. Posmenopáusica y senil
2. Juvenil
B) <i>Osteoporosis secundaria</i>
1. Endocrina: corteza suprarrenal (enfermedad de Cushing), trastornos gonadales (hipogonadismo), hipofisiaria (hipopituitarismo), páncreas (diabetes), tiroides (hipertiroidismo), paratiroides (hiperparatiroidismo)
2. Sustitución y expansión de médula ósea: mieloma, leucemia, enfermedad metastásica, enfermedad de Gaucher, anemias
3. Fármacos y sustancias: corticoesteroides, heparina, anticonvulsivos, inmunosupresores y alcohol (combinado con malnutrición)
4. Nefropatía crónica: enfermedad renal crónica, insuficiencia hepática, mala absorción gastrointestinal, inmovilización crónica
5. Déficit de vitamina D, vitamina C, calcio y malnutrición
6. Alteraciones congénitas del metabolismo: osteogénesis imperfecta, homocistinuria

1.2.1. Osteoporosis secundaria a diabetes mellitus (DM)

La DM es la cuarta causa de muerte en los países desarrollados y constituye una amenaza creciente para la salud mundial. Afecta a más de 230 millones de personas en el mundo (2,5 millones de personas en España) y se calcula que para el año 2025 esta cifra aumentará hasta alcanzar los 333 millones (el 6 % de la población mundial). La DM se describe como un desorden metabólico multifactorial caracterizado por una hiperglucemia [niveles basales de glucosa en plasma superiores o iguales a 200 mg/dl (110)] crónica como consecuencia de alteraciones en la secreción y/o en las acciones de la insulina. Puesto que la insulina afecta al metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas en los tejidos en los que actúa, sus alteraciones a largo plazo en la DM incluyen disfunciones de varios órganos: retinopatía, nefropatía (que puede conducir al fracaso renal), neuropatía, y alteraciones cardiovasculares.

La DM tipo 1 (dependiente de insulina) se caracteriza por una escasa o nula producción de insulina como consecuencia de la destrucción de las células β de los islotes pancreáticos, asociada a mecanismos proinflamatorios que desencadenan un proceso autoinmune. Factores genéticos, ambientales y autoinmunes contribuyen al desarrollo de esta enfermedad. En la DM tipo 2 (independiente de insulina) existe una resistencia a la insulina como condición necesaria aunque no suficiente, ya que se precisan otros factores (dieta, obesidad y genéticos) que determinen su aparición. Mientras que la prevalencia media en España de este tipo de diabetes está entre el 5 y el 10% (incluyendo las diferencias entre sexos y grupos de edad), por encima de los 70 años esta prevalencia alcanza al 25% de la población (111). Sustancias como el ácido nicotínico, los GCs, la hormona tiroidea, los agonistas α y β -adrenérgicos y el interferón- α pueden inducir DM a través de alteraciones en la secreción de insulina (112).

1.2.1.1 DM y su influencia en el hueso

Desde hace relativamente pocos años, se ha prestado atención a las alteraciones del metabolismo óseo en el sujeto diabético (113-118). Los factores que definen los grupos de riesgo de osteoporosis en la población general (edad, genética, estado hormonal, hábitos alimenticios) se aplican a los pacientes diabéticos. Sin embargo, en éstos aparecen factores específicos relacionados con las complicaciones de la DM que se asocian a la pérdida de masa ósea y al riesgo de fracturas (119).

La DM tipo 2 se ha relacionado con un aumento del riesgo de fractura, aunque sus efectos sobre la DMO son controvertidos (118-122). Las variaciones de la DMO en estos pacientes se han atribuido a la heterogeneidad de las poblaciones estudiadas (p.e., con mayor o menor grado de obesidad) y/o a las diferentes metodologías utilizadas (123, 124). Las fracturas en estos pacientes se han relacionado con la neuropatía periférica asociada a osteopenia focal y con otras complicaciones de la diabetes independientes de la calidad ósea, como la obesidad (125,126).

Por otro lado, en los pacientes con DM tipo 1 existe una asociación clara entre la pérdida de masa ósea y la supresión de la formación ósea. Así, en este tipo de DM la osteopenia/osteoporosis es un hallazgo frecuente incluso en poblaciones jóvenes y constituye un factor de riesgo para padecer una fractura (118,119,127-133) que puede evolucionar a osteoporosis a largo plazo (118,121,122). En el caso de mujeres postmenopáusicas, este riesgo se eleva entre 7 y 12 veces en las diabéticas tipo 1 (128,133). Otros estudios demuestran que los pacientes con DM tipo 1 tienen un

aumento del riesgo a padecer una fractura de ente 1,3–2,3 veces en la columna lumbar, de 1,4–2,6 veces la cabeza del fémur y de 1,8 veces en el radio distal (134).

Los análisis de marcadores séricos de remodelado óseo en pacientes con DM tipo 1 sugieren que la resorción no está alterada (118) o incluso está disminuida (135). La tasa de formación ósea, sin embargo, es baja, en consonancia con la disminución de los niveles circulantes de OC. Esto sugiere que la disminución del número de osteoblastos y/o de la diferenciación osteoblástica podría contribuir a disminuir la formación ósea. Una disminución de la actividad osteoclástica podría también estar implicada en el decremento de maduración osteoblástica a través de factores de acoplamiento entre osteoblastos y osteoclastos (136). Por otro lado, la reducción de la actividad osteoclástica podría ser secundaria al déficit de maduración osteoblástica.

En ratones con DM tipo 1, se ha observado una disminución de diferenciación y de actividad osteoblástica (137,138). Además, los huesos de estos ratones poseen un aumento de la adipogénesis (138). Esta observación apoya la hipótesis manejada actualmente de la relación inversa entre adipogénesis y osteogénesis. Así, la inducción de la diferenciación adipocítica en células mesenquimales de la médula ósea (CMMO) *in vitro* reduce la formación de osteoblastos maduros (139). Diferentes factores, tales como BMPs, citoquinas y adipoquinas (como la leptina) y la PTH promueven la osteogénesis e inhiben la adipogénesis (140, 141). Por otro lado, existe una relación inversa entre la adiposidad ósea y la DMO en la osteoporosis (142, 143). La activación de PPAR γ a través de su unión a ligandos de ácidos grasos como los antidiabéticos troglitazona o la rosiglitazona induce la diferenciación adipocítica suprimiendo la maduración osteoblástica y la pérdida de masa ósea; mientras que ratones deficientes en PPAR γ tienen aumentada la DMO.

1.2.1.2 Factores implicados en la pérdida de masa ósea asociada a DM

Aunque la relación entre la DM tipo 1 y la osteoporosis se conoce bien desde el punto de vista epidemiológico, no son tan bien conocidos los mecanismos fisiopatológicos subyacentes. En este sentido, una variedad de factores endocrinos y/o locales parecen estar implicados en las alteraciones del metabolismo óseo en el estado diabético (Fig. 4).

El tratamiento con **insulina** en animales diabéticos normaliza la DMO y los marcadores de remodelado óseo (144). La osteopenia en los pacientes con DM tipo 1 se puede recuperar a medio plazo con insulino terapia y un adecuado control glucémico (145). Por otra parte, el tratamiento con insulina se ha asociado al incremento del riesgo de fractura de cadera en sujetos diabéticos (146). De hecho, la

duración del tratamiento con insulina podría ser un buen predictor de este riesgo de fracturas, especialmente en mujeres diabéticas tipo 2. Esto podría estar relacionado con el hecho de que la administración periódica de insulina conlleva un mayor riesgo de episodios de hipoglucemia y de caídas asociadas. El **IGF-1** estimula la proliferación y la diferenciación de los precursores osteoblásticos y potencia la síntesis de colágeno tipo 1, disminuye su degradación y aumenta la mineralización en los osteoblastos maduros. El tratamiento con IGF-1 recupera el crecimiento óseo normal en ratas diabéticas tipo 1 (147), aunque no resultó eficaz en este sentido en mujeres postmenopáusicas diabéticas tipo 2 (148).

La **amilina** es un péptido cosecretado con la insulina por las células β pancreáticas que regula la ingesta y absorción de nutrientes (149). Esta proteína estimula la proliferación de osteoblastos *in vitro* y actúa, probablemente a través del receptor de la calcitonina, reduciendo el desarrollo y la actividad de los osteoclastos, así como la resorción ósea (150). La amilina se ha detectado en el suero de pacientes con DM tipo 2 (pero no en los de tipo 1). La **leptina** lleva a cabo acciones contrapuestas sobre el hueso a través de dos mecanismos: 1) periférico y directo, estimulando la formación ósea e inhibiendo la resorción ósea, a través de un aumento de la relación OPG/RANKL (151); y 2) central e indirecto, inhibiendo la formación ósea (y probablemente la resorción) a través de su acción en el hipotálamo (152). Esta proteína podría estar implicada en la mayor osteogénesis observada en pacientes con DM tipo 2. La **preptina** es una hormona peptídica que incrementa la secreción de insulina mediada por glucosa. Recientemente, ha sido aislada de vesículas secretoras de insulina y amilina en las células β de los islotes pancreáticos (153). La preptina ejerce acciones anabólicas en los osteoblastos *in vitro* pero no afecta a la actividad osteoclástica. *In vivo*, la administración local de esta hormona incrementa la formación de hueso en ratones macho adultos (153).

En los últimos años, se ha comenzado a explorar el papel de las **incretinas intestinales**, particularmente los péptidos similares al glucagón (GLP)-1 y GLP-2, en la respuesta aguda postprandial de la resorción ósea. Se ha sugerido la existencia de un eje entero-óseo por el que la acción de estas hormonas canalizaría nutrientes hacia el tejido óseo (154). El GLP-1 posee una potente actividad insulínica y acciones directas sobre el metabolismo de la glucosa en tejidos extrapancreáticos. En sujetos normales, se ha observado una reducción significativa del telopéptido C-terminal del colágeno tipo 1, un marcador de resorción ósea, tras la administración de GLP-1 en el transcurso de una sobrecarga intravenosa de glucosa (155). El efecto antiresortivo de este factor parece debido a sus efectos sobre la secreción de calcitonina. Por otra parte, se ha demostrado recientemente el papel osteogénico del GLP-1 en ratas con

resistencia a insulina o diabéticas tipo 2 (156). Dosis farmacológicas de GLP-2 parecen disminuir la resorción ósea sin cambios en la formación, inclinando así el balance del remodelado óseo hacia esta última (155).

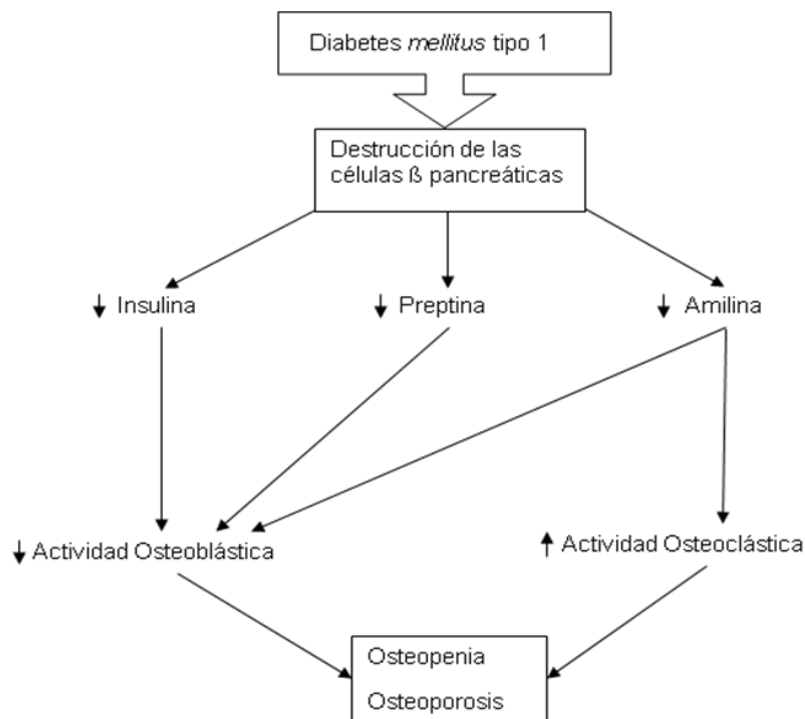


Figura 4. Mediadores endocrinos presumiblemente implicados en la pérdida de masa ósea asociada a la diabetes *mellitus* tipo I.

Una de las complicaciones más conocidas de la diabetes es la microangiopatía. Teniendo en cuenta la relación conocida entre formación ósea y **vascularización** (157), las alteraciones de ésta podrían estar relacionadas con la pérdida de masa ósea en el estado diabético. Un estudio en ratas diabéticas no obesas ha demostrado que el desarrollo de osteoporosis precede al de la microangiopatía; por lo que ésta podría ser un efecto más que una causa de la osteoporosis (158).

En ratas BB diabéticas, existe una disminución en la absorción duodenal de calcio (159). En este sentido, se han observado anomalías en el metabolismo de la **vitamina D** en animales diabéticos, con una supresión del $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y la consecuente alteración del remodelado óseo, así como niveles disminuidos de vitamina D en niños y adolescentes diabéticos con mal control glucémico. La hiperglucemia parece impedir la respuesta de osteoblastos y osteoclastos al $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en pacientes con DM tipo 2 (160). Por otro lado, la glucosuria produce por diuresis osmótica un exceso de excreción urinaria de calcio. Así pues, un balance negativo de calcio podría contribuir al aumento de resorción ósea en la DM.

1.2.2 Tratamientos farmacológicos de la osteoporosis

1.2.2.1 Estrógenos y moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERMs)

La terapia de reemplazo estrogénico en mujeres postmenopáusicas tiene efectos beneficiosos sobre la masa ósea, aunque no son tan patentes pasados los 5 primeros años desde la menopausia (161). Sin embargo, el uso continuado de estrógenos puede aumentar el riesgo de cáncer de mama o de útero y cardiovascular en ciertos pacientes (162). Los SERMs son compuestos sintéticos que actúan como agonistas o antagonistas de los estrógenos en los diferentes tejidos que responden a estas hormonas. Así, el tamoxifeno actúa como agonista de los estrógenos sobre la mama, previniendo el desarrollo de tumores en mujeres postmenopáusicas, mientras que actúa como antagonista de los estrógenos en el útero (163). El raloxifeno actúa sobre los receptores estrogénicos óseos inhibiendo la producción de citoquinas pro-resortivas y evitando la pérdida de masa ósea a nivel vertebral (164).

1.2.2.2 Bifosfonatos

Los bifosfonatos son compuestos sintéticos análogos al pirofosfato, formados por un esqueleto P-C-P más dos residuos variables en el carbono. Hoy en día son los agentes más comúnmente utilizados para prevenir y tratar la osteoporosis. Los bifosfonatos poseen avidez por la hidroxiapatita e inhiben la disolución de sus cristales como base de sus propiedades antirresortivas (165). Así, en el entorno óseo los bifosfonatos se asocian íntimamente a la superficie mineralizada. Al formar la laguna de resorción, los osteoclastos acidifican el medio, liberando a los bifosfonatos adheridos a dicha superficie, alcanzando concentraciones en el rango mM, y son internalizados por endocitosis por estas células, en las que bloquean diversos mecanismos intracelulares y provocan su apoptosis.

Los bifosfonatos de última generación como el zolendronato y el risedronato, contienen un anillo heterocíclico nitrogenado unido al C central, lo que determina una mayor avidez por la hidroxiapatita. Además, tras ser internalizados por los osteoclastos se pueden reciclar para volver a asociarse a la superficie ósea, lo que determina su eficacia prolongada para prevenir la pérdida de masa ósea tras una única dosis intravenosa (166). También se ha sugerido su efecto protector de la apoptosis en los osteoblastos (15). Como efecto negativo, su potente acción inhibitoria de la actividad

osteoclástica puede determinar la supresión del remodelado óseo, generando un hueso adinámico. Esto puede conllevar al aumento de fragilidad ósea por acumulación de microfracturas, como han demostrado algunos estudios *in vivo* (167, 168).

1.2.2.3 PTH

Desde su aprobación por la FDA (*Food and Drug Administration*) en EEUU en 2002 y en Europa en 2004, la PTH (1-34) recombinante humana (*teriparatide*) es el único agente anabólico óseo disponible actualmente para su uso clínico. Ha demostrado disminuir el riesgo de fractura hasta un 65% en pacientes osteoporóticos cuando se administra de forma intermitente (una inyección al día durante 18 meses), aumentando considerablemente la masa ósea tanto a nivel vertebral como apendicular (168).

La PTH ejerce sus acciones anabólicas en el hueso sobre células osteoprogenitoras, que expresan receptores PTHR1 en todas sus etapas de diferenciación. En administración intermitente, la PTH estimula la proliferación y diferenciación osteoblástica de estas células y de las células de revestimiento y disminuye su apoptosis, provocando un incremento neto en la formación ósea. Estos efectos parecen estar mediados por la activación de factores de transcripción como Runx2 y c-Fos y por la estimulación de IGF-1 y de TGF- β . Recientemente, se ha señalado la posible mediación de los osteocitos en dichas acciones anabólicas, al inhibir la PTH la secreción de esclerostina y así activar la diferenciación de las células de revestimiento (13). La PTH, sin embargo, tiene efectos opuestos en el hueso cuando se administra de forma continua, aumentando el número de UMRs con un componente preponderante de la resorción. Este efecto también está mediado por los osteoblastos, a través de un mecanismo que implica una disminución de la relación OPG/RANKL y un aumento de IGFBPs -que limitarían la cantidad de IGF-1 disponible- y de IL-6 e IL-11, con efectos osteoclastogénicos (169).

En modelos animales existen evidencias de que la combinación de la PTH con un antiresortivo, como el alendronato o la OPG, puede tener efectos beneficiosos sobre el remodelado óseo. Sin embargo, existen también evidencias en sentido contrario de que el tratamiento combinado acorta la respuesta anabólica de la PTH (170). Estas discrepancias podrían estar relacionadas con las dosis de PTH utilizadas y con la edad de los animales, que es importante en relación a la sensibilidad a la PTH. En humanos, la combinación de PTH con bifosfonatos atenúa los efectos anabólicos de la PTH (12). Una posible explicación es que los osteoclastos son necesarios para mediar la respuesta anabólica a la PTH al menos en roedores, lo que

enfatisa la importancia del mantenimiento de las señales locales entre osteoblastos y osteoclastos para mantener un nivel adecuado de remodelado óseo.

1.2.2.4 Terapias relacionadas con factores implicados en la vía Wnt

Como se ha comentado, los osteocitos producen esclerostina, cuyos niveles disminuyen tras el tratamiento con la PTH. Así pues, se ha planteado el desarrollo de anticuerpos contra la esclerostina como un posible nuevo tratamiento contra la osteoporosis. Un estudio en ratas ovariectomizadas ha demostrado que estos anticuerpos inducen una mayor formación ósea, aumentando la masa y resistencia ósea (171). En la misma línea, anticuerpos contra otro inhibidor de la vía wnt, DKK-1, también puede ser un tratamiento útil contra la osteoporosis, suprimiendo el crecimiento de tumores inducidos por un aumento de la resorción ósea, y aumentando la BMD, en ratones (172). Entre las nuevas vías de señalización se encuentra la de LRP5/serotonina, que según estudios recientes parece ser crucial para la masa y regeneración ósea (173).

Un nuevo candidato prometedor como agente terapéutico en esta patología es el AMG162 (*Denosumab*), un anticuerpo contra el RANKL humano. El tratamiento con este anticuerpo reduce la resorción ósea, aumentando la DMO en mujeres postmenopáusicas (174). Sin embargo, también reduce los niveles de marcadores de formación ósea (p.e. FA), lo que podría indicar una reducción en la activación de los osteoblastos como consecuencia de un menor número de osteoclastos.

1.2.3 La PTHrP como agente osteogénico en la osteoporosis

Se han evaluado los efectos anabólicos óseos del fragmento N-terminal de la PTHrP en ratas ovariectomizadas y en mujeres postmenopáusicas. En el modelo animal, se han obtenido resultados positivos sobre la masa ósea con tan sólo 13 días de tratamiento (89); y su administración intermitente durante 6 meses aumentó tanto la DMO como los parámetros histomorfométricos de formación ósea, así como las propiedades biomecánicas del hueso cortical y trabecular; aunque de modo menos eficaz que la PTH (1-34) (91). Esta menor eficacia de la PTHrP (1-36) respecto a la PTH (1-34) se interpreta como consecuencia de la distinta farmacocinética de ambos péptidos. En mujeres postmenopáusicas, una dosis de 400 µg/día de PTHrP (1-36) durante 12 semanas indujo un aumento de OC y una disminución de derivados peptídicos del colágeno tipo 1, marcadores de resorción ósea; asociados a un aumento del 5% en la DMO de la columna lumbar (90).

Por otra parte, la administración diaria intermitente de PTHrP (107-111) durante 13 días a ratas ovariectomizadas restauró la masa ósea y el contenido de calcio del fémur, aparentemente a expensas de un aparente efecto osteogénico sobre el hueso cortical (89). Recientemente, se ha demostrado que ratones con supresión de ambas regiones media y C-terminal de la PTHrP presentan osteoporosis y una disminución de la formación ósea (175). Además, en un estudio reciente, nuestro grupo ha demostrado que la administración subcutánea cada 2 días durante 2 semanas del fragmento nativo PTHrP (107-139), de modo similar a la del fragmento N-terminal PTHrP (1-36), revierte los efectos deletéreos de la 3-metilprednisolona (176).

Los mecanismos asociados a estas acciones anabólicas y/u osteogénicas de la PTHrP no están suficiente estudiados. Se sabe que la exposición transitoria al fragmento N-terminal de la PTHrP aumenta la síntesis de colágeno y la diferenciación osteoblástica en diferentes tipos de preparaciones osteoblásticas (84, 177). Un hallazgo de nuestro grupo a resaltar en este sentido, es que ambos dominios de la PTHrP, N- y C-terminal, estimulan la expresión de VEGF en células osteoblásticas humanas (84,178). Sin embargo, sólo la PTHrP (107-139), y no la PTHrP (1-36), es capaz de interactuar con el VEGFR2 para inducir la diferenciación y viabilidad osteoblástica (84,100). Esto abre nuevas perspectivas para llegar a entender las posibles acciones anabólicas del fragmento C-terminal de la PTHrP, teniendo en cuenta la estrecha relación entre angiogénesis y osteogénesis para modular la formación ósea.

1.3 Regeneración ósea y biomateriales

1.3.1. La regeneración ósea

La comprensión de los mecanismos de regeneración es fundamental para entender el comportamiento del tejido óseo tras el implante de una prótesis o durante la recuperación de una fractura. La principal complicación de la osteoporosis es la fractura; en las intervenciones relacionadas con esta patología (como la reconstrucción de cadera, el implante o la sustitución de prótesis articulares) es necesaria una adecuada regeneración ósea en torno a la zona intervenida que evite la pérdida de movilidad. Sin embargo, los estudios de este tipo en condiciones de osteopenia/osteoporosis son escasos.

A diferencia de los tejidos blandos, cuya reparación va asociada a la producción de tejido fibroso, el hueso neo-formado es indistinguible del tejido no

dañado. Se sabe que los procesos de reparación ósea en adultos reproducen el desarrollo normal del esqueleto durante la embriogénesis (179). La formación ósea en el feto comienza con la condensación de células mesenquimales seguida de su diferenciación a condrocitos (osificación endocondral) o directamente a osteoblastos (formación ósea intramembranosa). En la mayoría de las fracturas, la formación del callo implica una combinación de osificación intramembranosa y endocondral (179). Sin embargo, factores como la inflamación, la escasez de células pluripotentes y osteoprogenitoras y el aumento de las fuerzas mecánicas a las que se ve sometido el hueso adulto son diferentes a la situación durante la embriogénesis. Los procesos moleculares y celulares implicados en la regeneración ósea son poco conocidos. La hipoxia y la inflamación inducen un aumento de vascularización alrededor de la zona dañada, y factores como las BMPs, la PTHrP, así como la vía Wnt y las MAPKs parecen jugar un importante papel modulador actuando en la celularidad del entorno óseo (células endoteliales, osteoclastos y células mesenquimales).

Existen diferentes estrategias para promover la reparación y/o regeneración ósea. Una de ellas implica el uso de agentes que aumenten la vascularización y el número de osteoblastos promoviendo su maduración. La PTH ejercería acciones anabólicas en estas circunstancias a través de la activación de la vía cAMP-PKA, inductora de formación ósea *in vivo* e *in vitro* (180), ya que además interacciona con otros factores locales como la PTHrP, BMPs, Wnt- β -catenina, EGF, FGF, cruciales en el hueso. El uso de agentes de la vía Wnt como posibles agentes anabólicos en regeneración ósea plantea más complejidad, ya que sus acciones dependen del estado de diferenciación de las células. Además, esta vía está implicada en procesos tumorales. De cualquier modo, antagonistas de la vía Wnt, como DKK-1, SFRP (proteínas secretadas relacionadas con frizzled) o esclerostina, están siendo estudiados en este sentido. En modelos en roedores con patologías asociadas a una baja DMO y elevado remodelado óseo, se ha demostrado que la inhibición de estos factores promueve la formación ósea (181,182).

Una estrategia alternativa para acelerar la reparación ósea la constituye el uso de células pluripotenciales mesenquimales. Éstas proliferan y se diferencian a cartílago o a células de linaje osteoblástico en respuesta a factores de crecimiento y citoquinas liberados por plaquetas, células inflamatorias y células y tejidos adyacentes en la zona de fractura (183). Recientemente, se ha demostrado un efecto reparador del callo de fractura por inyecciones *in situ* de osteoblastos autólogos (184). La utilización de estas células en combinación con biomateriales y/o factores osteogénicos ha demostrado ser eficaz en la regeneración ósea (178).

1.3.1.1 Modelos de regeneración ósea

Los modelos experimentales de regeneración ósea más establecidos son los de fractura y los modelos de osteoinducción u osteointegración con biomateriales, por su capacidad de transferencia a la práctica clínica (185,186). La mayoría de estos modelos cursan con la formación de un callo cartilaginoso. Además, existen los modelos de regeneración ósea por ablación de médula y el de osteogénesis por distracción (OD). En el primero, el componente de formación ósea endocondral es mínimo y la regeneración observada se debe mayoritariamente a la formación ósea intramembranosa, por diferenciación osteogénica directa de las células (187). La OD es un modelo de regeneración utilizado inicialmente como técnica quirúrgica en el tratamiento de daños y deformidades óseas. En este modelo se produce una neoformación ósea asociada a la tensión generada al separar mecánicamente dos segmentos óseos. Al igual que en una fractura, se produce un aumento de flujo sanguíneo en las inmediaciones de la zona de separación. Aunque a veces se observan pequeñas cantidades de cartílago, la formación ósea observada durante la DO se debe a la formación ósea intramembranosa (188).

1.3.1.1.1 Modelo de regeneración ósea por ablación medular

Este modelo se lleva a cabo por extracción de la mayoría de la médula ósea de un hueso largo (tibia o fémur) a través de una incisión en una de las epífisis, utilizando una fresa de dentista. Tras el cierre de la incisión, se inicia el proceso de regeneración de la zona afectada (detallado en el apartado 3.1.1.1). La evolución del modelo es muy reproducible y permite estudiar en un periodo relativamente corto el papel de agentes osteogénicos sobre la diferenciación de las células osteoprogenitoras en el componente medular remanente. Estudios previos en este modelo han determinado la implicación de factores tales como Runx2 o *klotho* (molécula implicada en el envejecimiento, cuyo nombre proviene del mito griego de las Moiras o controladoras del destino) en la regeneración ósea en ratones *knockout* para estos genes (184, 185), así como las BMPs (189). Este modelo ha sido utilizado recientemente para evaluar los efectos deletéreos de los GCs y de la DM sobre la regeneración ósea en roedores (190, 191), así como los efectos osteoformadores de análogos de la vitamina D en el ratón (192).

1.3.1.1.2 Modelo de defecto cavitario

Tras una lesión traumática, el grado de reparación ósea depende del tamaño del defecto óseo y de la localización de la lesión. En el caso de defectos críticos, es

decir defectos que no se reparan completamente de forma espontánea, se utilizan biomateriales para bien rellenar la cavidad generada en el tejido óseo dañado o estabilizar el defecto estimulando la actividad y/o proliferación celular. Así pues, este tipo de modelos experimentales se llevan a cabo en fémures o tibias de ratas, conejos o perros (193) en los que se provoca el defecto cavitario con una fresadora de velocidad media. Normalmente, este tipo de defectos se producen de forma sencilla y rápida, por lo que la intervención quirúrgica presenta una escasa incidencia de complicaciones infecciosas en los animales de experimentación. Además, no compromete la continuidad del hueso y la técnica quirúrgica es fácilmente reproducible (194).

1.3.2 Biomateriales

Cuando se producen fracturas traumáticas o en ciertas patologías óseas (asociadas a osteonecrosis), el tejido óseo no es capaz de regenerarse por sí mismo. En estos casos, se requiere un injerto óseo o un sustitutivo sintético para promover la reparación ósea. Como es obvio el mejor sustituto óseo es el propio hueso, ya sea proveniente del propio paciente (autoinjerto) o bien obtenido de un donante (aloinjerto). Sin embargo, existen problemas asociados al uso de injertos óseos como la insuficiente cantidad de tejido disponible cuando se trata de autoinjertos o el riesgo de transmisión de enfermedades en el caso de aloinjertos. Estas limitaciones han propiciado el desarrollo de materiales de origen sintético que reemplacen el tejido óseo dañado (biomateriales).

Los biomateriales se pueden definir como “materiales implantables que desarrollan su función en contacto con tejidos vivos” (195). Es conocido que la reactividad de un material sólido comienza en su superficie. Este hecho es de particular importancia en el campo de los biomateriales, en contacto con un medio acuoso y en presencia de células y una diversidad de proteínas. En el desarrollo de cualquier biomaterial se deben tener en cuenta dos conceptos clave: biocompatibilidad y biofuncionalidad. Por biocompatibilidad se entiende la capacidad del material para ser aceptado por el medio biológico en contacto con el mismo. En el caso de implantes ortopédicos la biofuncionalidad del biomaterial debe asegurar una buena transmisión de cargas y distribución de fuerzas entre el hueso y el implante. Por otro lado, deben ser biocompatibles, es decir, que no produzcan reacciones adversas en la interfaz tejido-material (196).

La respuesta al biomaterial comienza con una reacción inflamatoria y concluye con un proceso de reparación. La fase inflamatoria aguda se caracteriza por vasodilatación y aumento de la permeabilidad capilar, extravasación sanguínea

(hematoma) y elevación de la presión local. La liberación de citoquinas y factores de crecimiento de las plaquetas que conforman el hematoma ejercen un efecto estimulador de la regeneración ósea (197). De hecho, tanto el PDGF como el TGF- β son factores osteogénicos bien caracterizados (198,199). La rugosidad del material influye en el número y grado de activación de las plaquetas. En este proceso inicial, se facilita la migración de leucocitos y macrófagos, que se encargan de la fagocitosis del coágulo, del tejido necrosado y de las partículas del biomaterial. Esta fase continúa con células gigantes multinucleadas, que dan lugar a la formación de un tejido granulado. La demanda de O₂ se incrementa en el interior del coágulo, donde aún no se ha establecido una vascularización suficiente, lo que resulta en un incremento local de la concentración de lactato. Este, junto con los ácidos y enzimas lisosomales liberadas del tejido necrosado, disminuyen el pH del entorno. La hipoxia provee la señal quimiotáctica para las células endoteliales y mesenquimales que inician la angiogénesis. En la fase de reparación, el tejido de granulación da lugar inicialmente a uno fibroso, que conforma una matriz extracelular poco vascularizada. Su vascularización inicia la migración de células con potencial osteogénico y una reorganización de la matriz fibrosa con retracción de las fibras de colágeno y fibrina. Estas células comienzan a sintetizar matriz extracelular y nódulos de mineralización en la proximidad de la lesión; algunos de estos nódulos atrapan a las células diferenciadas en osteocitos. El proceso de mineralización continua con el crecimiento de cristales de fosfato cálcico y el ensamblaje de las capas de matriz de colágeno con las mineralizadas da como resultado el nuevo hueso.

Entre los biomateriales artificiales utilizados en ortopedia se encuentran metales, polímeros y cerámicas. Los metales poseen problemas asociados con la corrosión y la toxicidad, pero su comportamiento mecánico es óptimo (194). Los polímeros no presentan buena bioactividad (osteointegración) (195,200). Las cerámicas son los materiales más biocompatibles y poseen propiedades bioestables, bioactivas o bioreabsorbibles (194,200), pero a su vez poseen cierta fragilidad y pueden aparecer partículas alrededor del material implantado a consecuencia de su degradación o por deficiencias en su procesado. Los materiales cerámicos más utilizados en la clínica son aquellos que son bioactivos (con propiedades osteoconductoras) como los fosfatos cálcicos, los vidrios y las cerámicas de vidrio; u otras con carácter inerte, que presentan una gran resistencia mecánica y estabilidad *in vivo* pero que tienen una influencia prácticamente nula en el tejido óseo adyacente, como la alúmina y el zirconio. Más recientemente, se han diseñado materiales cerámicos mesoporosos bioactivos que permiten la adsorción y liberación controlada de distintas moléculas (p.e. antibióticos) con buenas expectativas en la aplicación clínica (195).

1.3.2.1 Materiales mesoporosos

Los materiales mesoporosos ordenados pueden actuar como vidrios bioactivos pero además tienen una estructura formada por un esqueleto de sílice (SiO_2) con una distribución homogénea de poros, cuyo tamaño oscila –según el tipo de material y el método de preparación- entre 2-50 nm (201). Además, el esqueleto inorgánico contiene grupos silanol (Fig. 5A), susceptibles de ser funcionalizados con una variedad de moléculas orgánicas, de distinta polaridad. Estos materiales son biocompatibles y bioinertes. Existen diferentes tipos de estos materiales: SBA (*Santa Barbara Amorphous*)-15, MCM (*Mobil Composition of Matter*)-48 y MCM-41 (202,203). El SBA-15 contiene una estructura hexagonal de poros cilíndricos con un diámetro de 5-10 nm; mientras que el MCM-48 con estructura más compleja que la anterior contiene dos sistemas de canales tridimensionales no conectados entre sí de 4 nm de poro. El MCM-41 contiene un sistema hexagonal de poros cilíndricos, con un tamaño que puede variar entre 3 y 5 nm (203, 204), pero no es bioactivo. Estos materiales también se han diseñado para rellenar un defecto crítico a nivel metafisario en animales. Alternativamente, se encuentran disponibles en triturado para rellenar defectos cavitarios en animales pequeños. La implantación de estos materiales conlleva una posible reacción inflamatoria y a veces infecciones. Así pues, la ingeniería de tejidos es una excelente alternativa, al iniciarse la reparación con el biomaterial *in vitro* y, posteriormente, su implante en la zona tisular dañada. Esto requiere el uso de materiales-andamiajes (*scaffolds*) como estructuras tridimensionales de soporte celular (osteoblastos o precursores) que promuevan la formación tisular. Además, la posibilidad de controlar las temporalidades necesarias para una respuesta positiva y de modificar y funcionalizar la superficie del material, así como la introducción de sustancias osteogénicas (202) dentro de los poros como estimuladores de la reparación ósea, abren un campo con expectativas de aplicaciones médicas específicas.

1.3.2.1.1 SBA-15

Una ventaja de este tipo de cerámica es su mayor volumen de poro y la elevada concentración de grupos Si-OH (202-204). Estos grupos hidrofílicos pueden interactuar con distintas especies químicas y ser funcionalizadas como Si-O-R. Si R es un silano (Si-X), siendo X un fragmento hidrocarbonatado, el entorno del poro puede convertirse en hidrofóbico. Además, este material presenta una serie de microporos interconectados (Fig. 5B) que podría promover una mayor difusión iónica desencadenando una mayor respuesta bioactiva que el MCM-48 citado.

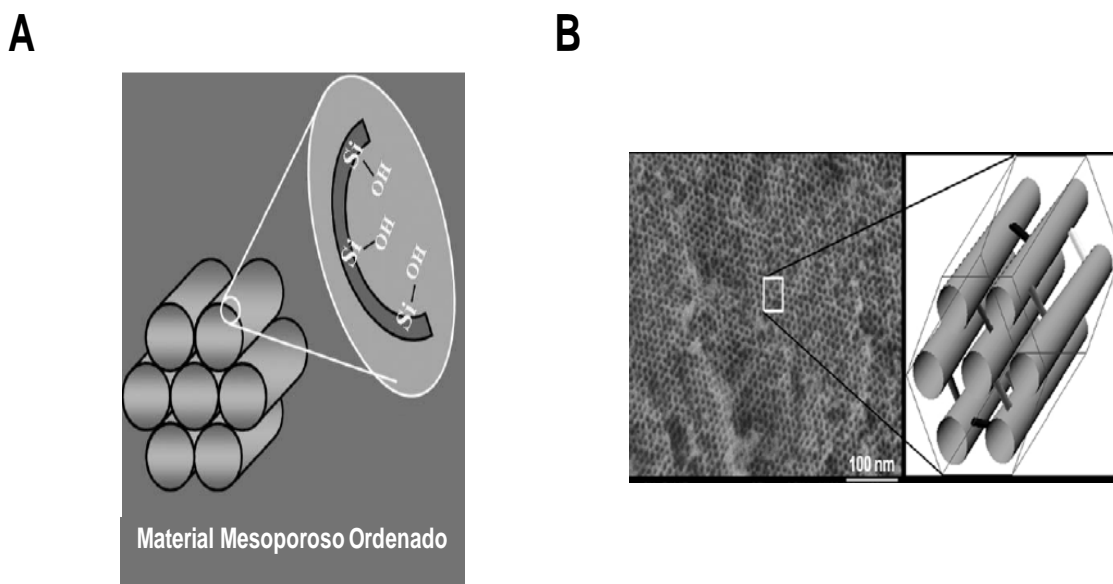


Figura 5. (A) Presencia de los grupos silanol en la superficie de las cerámicas mesoporosas de estructura ordenada. (B) Imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido del material SBA-15 y una representación de la distribución de los poros (imagen cedida por el Dr. Freddy Kleitz de la Universidad de Laval, Québec, Canada).

Una funcionalización apropiada del SBA-15 podría adaptar la cinética de liberación de una biomolécula específica a los requerimientos del entorno biológico. Así, se pueden modificar mediante la incorporación de componentes orgánicos, tanto en la superficie de los canales, como parte integral de las paredes o de forma selectiva. La modificación orgánica de los materiales mesoporosos permite controlar las propiedades superficiales y el tamaño de poro, pudiendo proporcionar a su vez una mayor estabilidad térmica, mecánica o estructural, por ejemplo frente a la hidrólisis. De hecho, en un trabajo reciente se estudió la captación y la liberación del L-triptófano cargado en el material SBA-15 y en una versión funcionalizada del mismo (C8-SBA-

15) (205). Por todo ello, este tipo de material puede ser de gran utilidad en tecnologías de regeneración ósea (206, 207).

Como corolario a lo expuesto en esta Introducción, podemos concluir que la PTHrP es un factor local importante en el tejido óseo, con acciones pleiotrópicas sobre el remodelado óseo y la formación ósea. Estas acciones parecen ejercerse a través de la interacción de diferentes dominios de la molécula de PTHrP (algunos de ellos incluidos en fragmentos secretados de esta proteína) con distintas especies celulares residentes en el hueso. En particular, el posible fragmento nativo C-terminal 107-139 de la PTHrP posee una acción antiresortiva bien caracterizada cuya relación con ciertas propiedades osteogénicas descritas en la literatura es actualmente desconocida. Estos datos plantean la posibilidad de que este fragmento de la PTHrP podría promover la formación ósea en situaciones de pérdida de masa ósea asociada a alteraciones metabólicas o traumáticas.

2. Hipótesis y objetivos

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Teniendo en cuenta estos considerandos, hipotetizamos que:

La administración sistémica y/o local del fragmento C-terminal de la PTHrP ejerce acciones osteogénicas y promueve tanto la formación como la regeneración ósea en situación de osteopenia y en la reparación de defectos óseos.

Para confirmar o rechazar esta hipótesis, en la presente Tesis Doctoral se plantearon los siguientes objetivos:

- 1.- Caracterizar las acciones osteogénicas de la PTHrP (107-139) en un modelo de regeneración ósea intramembranosa en un modelo de osteopenia asociada a la DM tipo 1.
- 2.- Caracterizar las acciones osteogénicas de la secuencia peptídica 107-111 (osteostatina) del fragmento PTHrP (107-139) cargada en biocerámicas en un modelo de regeneración ósea tras un defecto cavitario en fémur.
- 3.-. Evaluar estas acciones osteogénicas *in vitro* en células osteoblásticas de diferente grado de diferenciación.
- 4.- Comparar estos efectos osteogénicos de la PTHrP C-terminal con los inducidos por el fragmento N-terminal de la PTHrP, como péptido anabólico control.

3. Materiales y métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Modelos experimentales

3.1.1 Modelos experimentales *in vivo*

Todos los estudios fueron desarrollados con la aprobación del Comité de Experimentación Animal de la Fundación Jiménez Díaz. El dolor y el sufrimiento de los animales se disminuyeron de acuerdo a la normativa europea.

3.1.1.1 Modelo de regeneración ósea en ratón con bajo remodelado óseo (DM tipo 1)

Los ratones CD-1 macho (de 11 semanas de edad) fueron suministrados por los Laboratorios Harlan (Harlan Interfauna Ibérica, Barcelona, España) y estabilizados en las instalaciones del Animalario de la Fundación Jiménez Díaz durante dos semanas. Los animales fueron pesados y se inyectaron intraperitonealmente con Estreptozotocina (STZ) (45 µg/g de peso corporal en tampón citrato sódico 50 mM, pH 4,5), una citotoxina para las células beta pancreáticas, o sólo tampón (controles) durante 5 días. Siete días después de la última inyección, se midió la glucosa en sangre extraída de la cola del ratón (Glucocard G+-meter, A. Menarini Diagnostics, Florencia, Italia). Los ratones con niveles de glucosa en sangre superiores a 300 mg/dl fueron considerados diabéticos. Los animales tuvieron acceso libre a agua y a una dieta estándar (8,8 g/Kg de calcio y 5,9 g/Kg de fósforo; Panlab, Reus, España) en una habitación mantenida a 22 °C con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. A las dos semanas de la confirmación de la diabetes, los ratones fueron tratados con PTHrP (107-139) o PTHrP (1-36) (como péptido anabólico control) (100 µg/Kg/cada dos días, por inyección subcutánea) o vehículo (50 mM KCl, pH 4,5) durante 13 días.

Ablación de médula ósea en la tibia de ratón

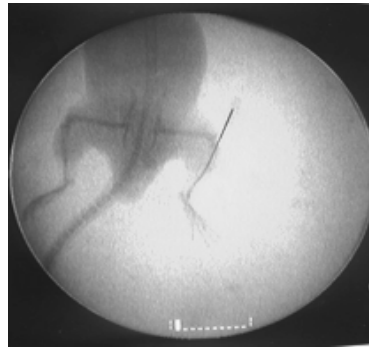
Al octavo día del comienzo del tratamiento (6 días antes del sacrificio) con el fragmento C o N-terminal de la PTHrP o el vehículo, los ratones fueron anestesiados con ketamina/xylazina (2:1, v/v), para extraer la médula ósea de ambas tibias de cada ratón (191). Se efectuaron incisiones oblicuas sobre el ligamento patelar y la

tuberosidad tibial. Se abrió un orificio en dicha zona utilizando una jeringa de 26g en el que se introdujo una fresa de dentista (de diferentes calibres) en la cavidad medular con la finalidad de extraer la mayor cantidad de médula ósea (Fig. 6A). Finalmente, ésta fue extraída cuidadosamente y la cavidad medular se vació y rellenó con salino estéril. La incisión fue cerrada de inmediato tras la operación.

En el modelo de regeneración ósea por ablación de médula dicha regeneración se debe en su mayor parte a la formación ósea intramembranosa, por diferenciación osteogénica directa de las células mesenquimales (187). El proceso regenerativo transcurre en varias etapas (Fig. 6B): en una primera fase, se produce un hematoma en la zona en la que se ha llevado a cabo la ablación; al día 4, se observan abundantes células necróticas y algunas células mesenquimales inmaduras; al día 6, estas células mesenquimales son reemplazadas por células óseas de nueva formación; entre los días 6 y 8, comienza el restablecimiento de los elementos celulares de la médula mientras va desapareciendo el hueso nuevo; este remodelado de la médula ósea continúa entre los días 10 y 16. A los 21 días, el hueso presenta un aspecto normal (192,187). Teniendo en cuenta lo anterior, se eligió 6 días como período de estudio de regeneración, al existir neoformación ósea observable en la metafisis de la tibia en regeneración. Así pues, a este tiempo tras la ablación, y 24 horas después del último tratamiento con los péptidos de la PTHrP o el vehículo salino, los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical.

Los ratones (n=10 en el grupo de ratones diabéticos; n=5 en el resto de grupos de estudio) para cada grupo experimental) fueron pesados y se controló la glucemia a lo largo del estudio. Las tibias de cada animal se lavaron y limpiaron de cartílago y tejidos blandos y se asignaron para evaluaciones histológicas e inmunohistoquímicas o se congelaron en nitrógeno líquido para la extracción de ARN total. Los fémures fueron también extraídos, limpiados y congelados a -20°C para estudios de microtomografía computerizada (μ CT), o se conservaron en nitrógeno líquido hasta la extracción de ARN. En algunos casos, de la médula ósea de la tibia y el fémur se obtuvieron cultivos primarios de células mesenquimales (CMMO) (*ex vivo* e *in vitro*), como se describe más adelante.

A



B

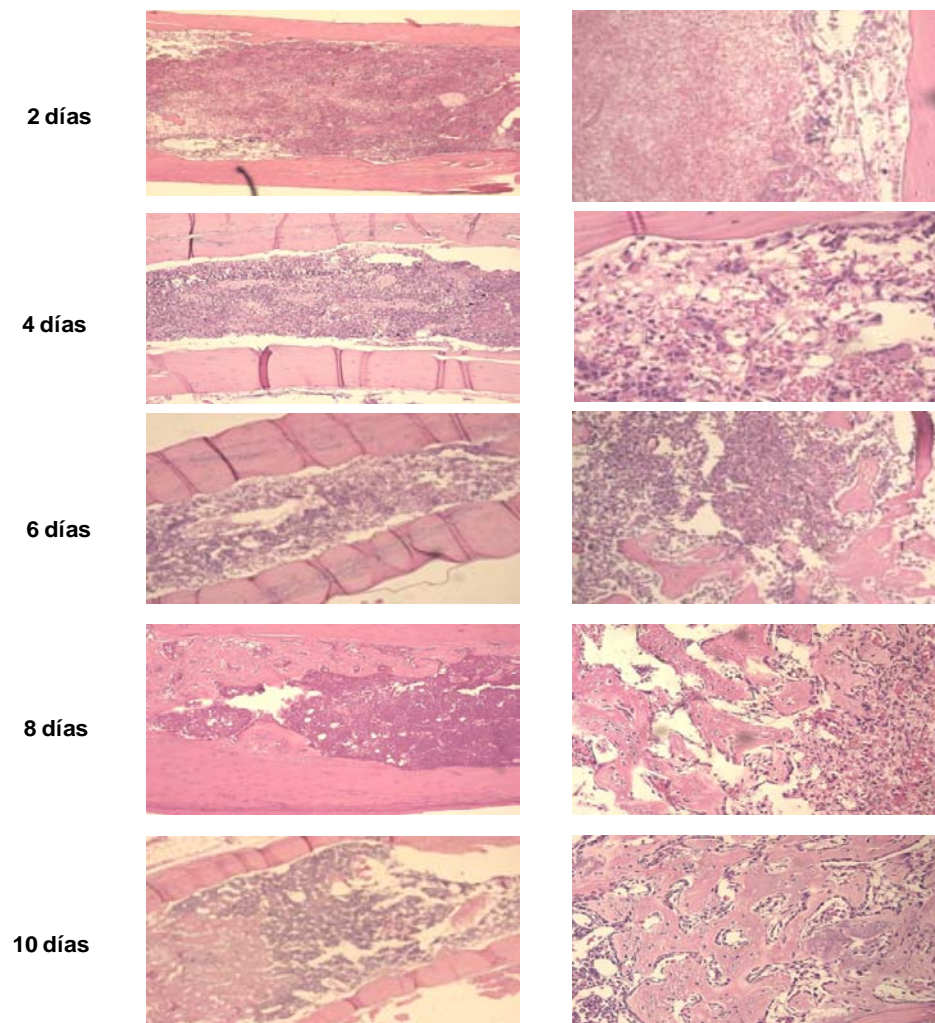


Figura 6. (A) Radiografía de alta resolución que muestra una fresa de dentista insertada a través de la epífisis proximal de la tibia izquierda de ratón, ocupando la cavidad medular en toda su longitud. (B) Micrografías de tinción con Hematoxilina-Eosina de la tibia en regeneración de ratón tras diferentes días de la ablación de médula ósea (200x).

3.1.1.2 Modelo de regeneración ósea tras implante en un defecto cavitario en el fémur del conejo

3.1.1.2.1 Preparación de los materiales

El material mesoporoso SBA-15 fue sintetizado utilizando un método basado en el uso de un surfactante, como agente director de estructura, y tetraetilortosilicato (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) como fuente de sílice (208). Esta estructura fue confirmada por difracción de rayos X (DRX) y análisis de adsorción de N₂. La funcionalización de sílice se llevó a cabo con el método post-sintético o *grafting* del anclaje de un alcoxisilano, N-octiltrietoxisilano (C8, Sigma-Aldrich), como se describe (205). Se confirmó por espectroscopia infrarroja utilizando transformadas de Fourier y por análisis elemental. El material funcionalizado resultante contiene un 11% en peso (0,97 mmol/g) de fracciones orgánicas, lo que permite calcular el grado de funcionalización.

Para los experimentos, ambos tipos de material SBA-15 fueron conformados en discos de 50 mg (6x2 mm) por presión uniaxial (1MPa) e isostática (1MPa). Los materiales fueron expuestos a radiación ultravioleta en una cámara de cultivos celulares (FLV120, Tecnología para Diagnóstico e Investigación, Madrid) durante toda la noche para su esterilización.

La unión de la PTHrP (107-111) (Bachem, Bubendorf, Suiza) al material se efectuó por inmersión en una solución del péptido (100 nM) en 1 ml de tampón salino fosfato, pH 7,4 (TSF) a 4 °C con agitación durante 24 horas (209,210). La captación y liberación del péptido por parte de los materiales cargados se determinó utilizando ¹²⁵I-[Tyr¹¹⁶] PTHrP (107-115) (200.000 cpm o 140 fmoles) como trazador junto con el péptido frío durante la carga como se ha mencionado anteriormente. La [Tyr¹¹⁶] PTHrP (107-115) se marcó con Na¹²⁵I (2,130 Ci/mmol; MP Biomedicals, Solon, OH) usando cloramina-T, y el péptido marcado se purificó a máxima actividad específica por HPLC en una columna µBondapak C18 utilizando un procedimiento estándar (211). Para ello, los materiales fueron depositados en placas de cultivo celular con 1 ml de medio de cultivo (ver más adelante) y se mantuvieron a 37°C. La radioactividad captada en 24 h y la liberada al medio fue monitorizada secuencialmente a diferentes tiempos (alícuotas de 100 µl) en un espectrómetro de radiación γ.

3.1.1.2.2 Producción del defecto cavitario en conejo

Se utilizaron conejos blancos Nueva Zelanda hembras y con una edad de 24-30 semanas (n=2-5). La intervención quirúrgica se realizó bajo anestesia general. Los

conejos fueron rasurados en ambas rodillas para crear los defectos cavitarios lateral y medial con una fresa de media velocidad (5 mm de diámetro y 4-5 mm de profundidad) (212). A continuación, se implantaron los materiales a ensayar y las heridas fueron suturadas. El defecto lateral femoral derecho recibió el material SBA-15 sin el péptido; y el defecto medial derecho el biomaterial SBA15 cargado con PTHrP (107-111). El defecto femoral lateral izquierdo recibió el material SBA-15 funcionalizado con C8, mientras que el biomaterial C8-SBA-15 cargado con PTHrP (107-111) fue implantado en el defecto femoral medial izquierdo. Los animales fueron sacrificados a las 4 y 8 semanas de estas intervenciones. Los fémures se distribuyeron para exámenes histológicos e inmunohistoquímica y análisis de μ CT.

3.1.2 Modelos experimentales in vitro

3.1.2.1 Cultivos de células mesenquimales de ratón

Las CMMO fueron obtenidas a partir de las tibias y de los fémures procedentes de los ratones controles y diabéticos tratados o no con los péptidos de la PTHrP, extraídos en el momento del sacrificio (174). La suspensión celular se preparó en medio α -MEM (Medio Esencial Mínimo α) con 15% de suero fetal bovino (SFB), 1% de penicilina-estreptomicina y 2,5 μ g/ml de fungizona por aspiración de la médula utilizando una jeringuilla de 25-g. Después de la centrifugación a 1500g durante 5 minutos, las células fueron resuspendidas en el mismo medio (sin fungizona). Se contó el número de células viables (por exclusión de azul de tripán) en un hemocitómetro y se sembraron a una densidad de $1-2,5 \times 10^6$ células por cm^2 en placas de 6 pocillos en CO_2 al 5% a 37°C (176). El medio de diferenciación osteogénico (el medio anteriormente mencionado con 50 μ g/ml de ácido de ascórbico y 10 mM de β -glicerolfosfato) fue añadido al cultivo al tercer día de la siembra. La mitad del volumen del medio condicionado se cambió cada dos días.

En algunos experimentos, los cultivos de CMMO procedentes de ratones controles fueron crecidos en este medio osteogénico o en medio adipogénico (α -MEM, SFB al 15%, 1% de penicilina-estreptomicina, y 2,5 μ g/ml de troglitazona), en presencia o ausencia de alta glucosa (25 mM), suplementados (o no) con PTHrP (107-139) o PTHrP (1-36) (100 nM). El medio y los estímulos se cambiaron cada 6 o 48 horas según los casos.

A los 14 días de cultivo, se determinaron el tamaño y el área de las colonias positivas para fosfatasa alcalina (FA+) y las totales, así como el número de adipocitos; además de la expresión génica de diferentes factores osteoblásticos y adipogénicos.

El número y el área de las colonias mineralizadas se analizaron a los 21 días de cultivo.

Las células pluripotentes de ratón C3H10T1/2 se mantuvieron en medio basal de Eagle con 10 % de SFB y 1% de penicilina–estreptomicina en CO₂ al 5% a 37 °C. Estas células se cultivaron durante 10 días en medio de diferenciación osteogénica (50 µg/ml de ácido de ascórbico y 10 mM de β-glicerolfosfato), en presencia o ausencia de STZ (0,5 mg/ml o 1 mg/ml). Posteriormente, se aisló el ARN total.

3.1.2.2 Cultivos de células osteoblásticas MC3T3-E1 de ratón

Las células osteoblásticas de ratón MC3T3-E1 (cedidas generosamente por el Dr. C. Zaragoza, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid) fueron cultivadas en medio α-MEM y 10% SFB, 1% de penicilina–estreptomicina, 5mM de L-glutamina. Las células se sembraron a una densidad inicial de 20.000 células/cm² y se cultivaron en medio de diferenciación (con 50 µg/ml de ácido ascórbico y 10 mM de β-glicerolfosfato) durante 5 días (80% confluencia) o 15 días (post-confluencia, para los estudios de mineralización), con o sin alta glucosa (25 mM) (o manitol, como control osmótico), en presencia o ausencia de PTHrP (107-139) o PTHrP (1-36) (100 nM). En algunos experimentos, se utilizaron los anticuerpos neutralizante policlonales de conejo anti-PTHrP C13 o PTHrP (107-111) C7 (dilución 1:100) (213), los antagonistas del PTHR1 [Asn¹⁰, Leu¹¹, D-Trp¹²] PTHrP (7-34) amida [PTHrP (7-34)] (1 µM) (84) y JB4365 (1 µM) (214) o PTHrP (109-138) (85), que fueron añadidos al medio con glucosa normal (5,5 mM) durante el crecimiento celular.

El medio de cultivo y los diferentes estímulos fueron reemplazados cada 48 horas. A los diferentes tiempos de estudio las células adheridas se tripsinizaron y se juntaron con las células no adheridas. El número total de células viables se determinó por exclusión del azul de tripán. A las 48 horas tras el último tratamiento con los estímulos se aisló la proteína y el ARN celular total como se describe más adelante. Además se determinó la actividad de FA y síntesis de colágeno (5 días) y la mineralización (15 días).

3.1.2.3 Estudios de bioactividad de la PTHrP (107-111) cargada en biomateriales

Los experimentos se desarrollaron en la línea celular MC3T3-E1. Las células fueron sembradas en medio osteogénico a una densidad inicial de 20.000 células/cm², e incubadas en el medio citado en el apartado anterior (2 ml) en presencia o ausencia (control) de diferentes concentraciones de PTHrP (107-111) o de los materiales SBA-15 y C8-SBA-15 (un disco por pocillo después de la siembra celular),

cargados o no con PTHrP (107-111), durante diferentes periodos de tiempo a 37°C en 5% CO₂. Para examinar la capacidad de los diferentes materiales cargados con la PTHrP (107-111) para retener su actividad biológica, en algunos experimentos los materiales fueron transferidos cada dos días a otro cultivo celular no expuesto previamente al material. El medio de cultivo y los diferentes estímulos fueron reemplazados cada 48 horas.

La proliferación y la viabilidad celular se analizaron con un sistema estándar CellTiter 96[®] AQueous Assay (Promega, Madison, WI) y con tinción de azul de tripán, respectivamente. Además, se aisló el ARN celular total como se describe más adelante. Además, se llevaron a cabo determinaciones de actividad de FA, síntesis de colágeno y mineralización.

3.2 Técnicas experimentales

3.2.1 *In vivo*

3.2.1.1 DXA

La DMO (g/cm²), el contenido mineral óseo (CMO, g) y el contenido graso de las muestras óseas fueron analizados por DXA utilizando un equipo PIXImus (GE Lunar Corp., Madison, WI) (215). El programa del Piximus calcula los parámetros citados con un coeficiente de variación de $\pm 2\%$, y almacena los datos en archivos de Microsoft Excell (Microsoft Corp., Way Redmond, WA)

3.2.1.2 Análisis de μ CT

Los fémures de ratón se descongelaron a temperatura ambiente, se sumergieron en salino, se cortaron con un disco de diamante (Grupo Komet, Lemgo, Alemania) y fueron escaneados con un sistema de microtomografía de alta resolución (SkyScan 1172, Skyscan N.V., Aartselaar, Bélgica). Todas las muestras fueron escaneadas con un tubo de rayos X con un voltaje de 100 kV y una corriente de 100 μ A sin filtro. El ángulo de rotación del escaneado fue de 185° y el ángulo de incremento de 0,40°. Las imágenes se reconstruyeron en función del algoritmo de Feldkamp (216). La microarquitectura del hueso trabecular se evaluó en la región metafisaria del fémur distal (un área de 1,5 mm de longitud comenzando a 0,6 mm de la placa de crecimiento) y entre los 2,5 y 3,1 mm para el análisis del volumen cortical (Fig. 7A), utilizando el programa SkyScan[™] CT-analyzer, versión 1.7.0.5.).

Las muestras de fémur de conejo se cortaron con un disco hiperflexible de granulometría fina (15 μm) y abrasión suave conectado a un motor quirúrgico (KaVo. Dental GmbH, Biberach, Alemania) a una velocidad de 15.000 rpm. Durante el proceso de corte, la muestra se irrigó constantemente con suero salino para prevenir el sobrecalentamiento y su deshidratación. Una vez escaneadas las muestras, se generaron las imágenes con la aplicación *DataViewer* (SkyScan). El ángulo de rotación del escaneado fue de 360°. Para el análisis cuantitativo y cualitativo del crecimiento óseo alrededor del implante se utilizó la aplicación *CTAn* (SkyScan). De cada muestra se analizaron un total de 70 imágenes. Los parámetros trabeculares fueron calculados en regiones seleccionadas (Fig. 7B) entre 0 y 5 pixels, 5 y 10 pixels, 10 y 15 pixels, y 15 y 20 pixels, siendo 1 pixel equivalente a 21,8 μm (Fig. 7B). Mediante la aplicación *CTVol* (SkyScan), se crearon los modelos tridimensionales tanto del biomaterial (que se ha considerado como un cilindro para mayor claridad de la representación) como del hueso formado a las distintas distancias de la superficie del implante.

El sistema de análisis proporcionó el cálculo de los siguientes parámetros (217):

Trabeculares

- Porcentaje de volumen óseo (BV/TV): Relaciona el volumen de tejido óseo calcificado respecto del volumen total del área analizada (%).
- Superficie ósea (BS): Superficie de hueso como sólido dentro del volumen de interés, medida en 3D (mm^2).
- Espesor trabecular (Tb.Th): Grosor medio de las trabéculas óseas calculado a partir de una reconstrucción 3D (mm).
- Factor de patrón de hueso trabecular (Tb.Pf): Índice de conectividad del hueso trabecular. Está basado en el principio de que una mayor concavidad trabecular indica una mayor conectividad, al aumentar la probabilidad de nodos de conexión entre las trabéculas. De esta forma, un Tb. Pf menor indica una mayor conectividad trabecular (mm^{-1}).
- Número trabecular (Tb.N): Número medio de trabéculas por milímetro lineal en el área trabecular (mm^{-1}).

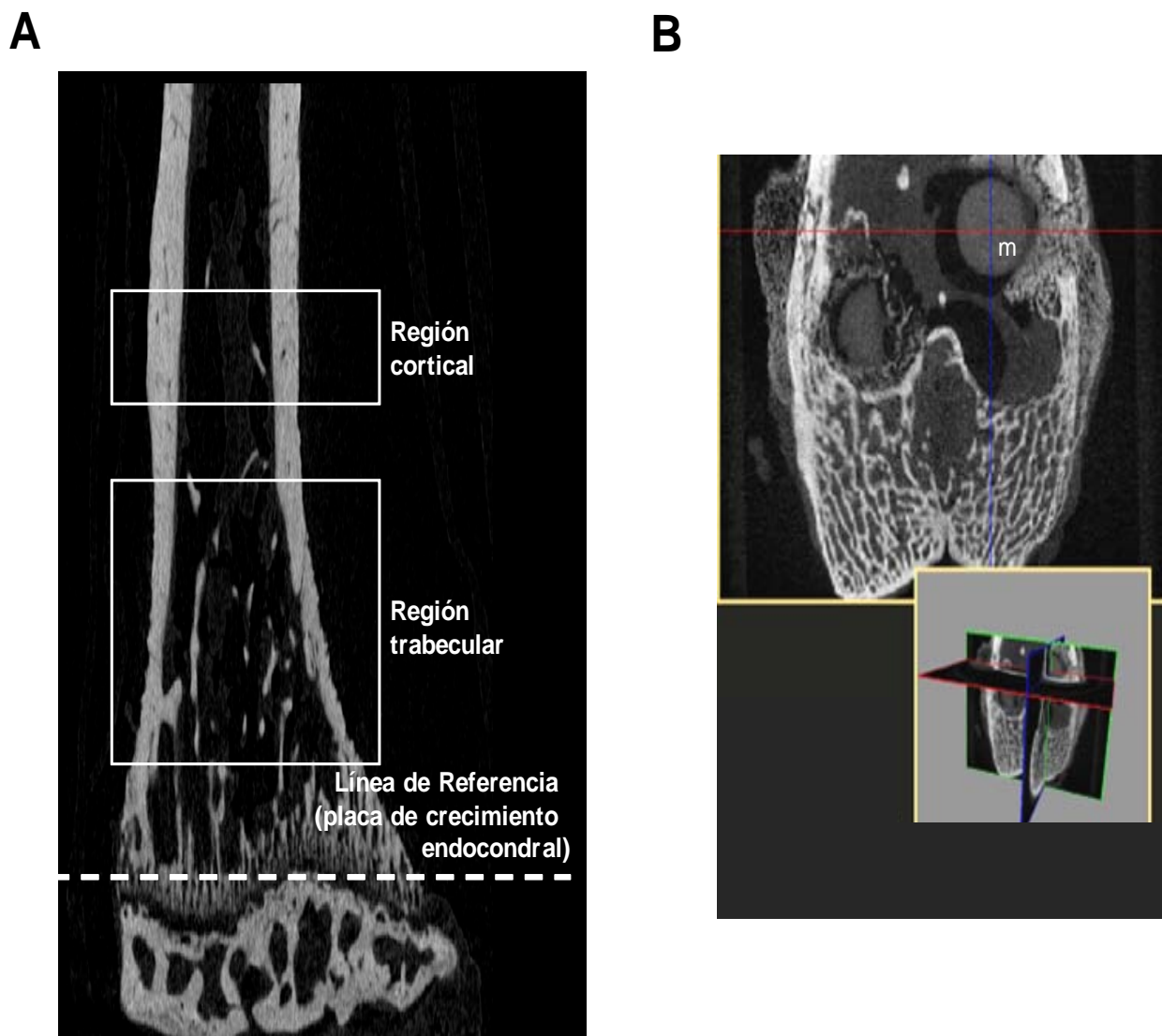


Figura 7. Imágenes por μ CT del fémur distal intacto del ratón mostrando los sectores cortical y trabecular utilizados para el análisis (A), así como del fémur distal del conejo con el biomaterial (m) incorporado (B).

- Grado de anisotropía (DA): Factor que determina el alineamiento preferencial de las trabéculas a lo largo de un eje. Así, la reconstrucción tridimensional del área trabecular se compara con diversos grupos de líneas direccionales paralelas, de forma que aquél que presente menos intersecciones con las trabéculas óseas indica una dirección preferente de alineamiento trabecular. Posteriormente se someten estos datos obtenidos a una serie de algoritmos que determinan el grado, que varía entre 1 (estructura completamente isotrópica o no alineada) e infinito (estructura completamente anisotrópica o alineada). Cabe destacar que un menor DA indica una mayor resistencia trabecular a las fuerzas direccionales a las que suelen estar expuestas (218).

- Índice de estructura del modelo (SMI): Factor numérico que representa la conformación tridimensional preferente de las trabéculas. Sus valores varían entre 0 (forma de plato), 3 (forma de cilindro) y 6 (forma de esfera). En la osteoporosis, normalmente las trabéculas muestran una transición de plato a cilindro, por lo que un mayor valor de este índice muestra una peor estructura ósea.

Corticales

- Espesor cortical (Ct.Th): Determina el grosor medio del tejido mineralizado de una serie de cortes transversales de la región cortical de interés (mm).
- Área de hueso cortical (B.Ar): Determina el área media de tejido mineralizado presente en una serie de cortes transversales de la región cortical de interés (mm²).
- Porosidad (Po): Cuantifica el área de espacios no mineralizados cerrados presentes en varios cortes transversales de la región cortical respecto al área de tejido mineralizado (%).
- Momento medio de inercia (MMI): Proporciona un cálculo básico de la resistencia mecánica esperada de una región cortical. Se obtiene calculando la resistencia ofrecida a la rotación en torno al eje longitudinal del hueso en varios cortes virtuales en el plano transversal de esta región (mm⁴).

3.2.1.3 Histología

Las muestras óseas se fijaron en p-formaldehído al 4% en TSF a 4°C. Las muestras fueron decalcificadas (24 h) en Mielodec (Bio-Optica, Milan, Italia) u Osteosoft (48/72 h) (Merk, Whitehouse Station, NJ), deshidratadas e incluidas en parafina. Los análisis histológicos se llevaron a cabo en secciones de 4 µm (en el caso de la tibia de ratón) o de 5-8 µm (en el caso de los fémures de conejo) sobre el plano sagital, depositadas sobre portaobjetos pretratados con 3-aminopropiltrietoxisilano (APES, Sigma-Aldrich) o con L-lisina (Polylysine, Thermo, Waltham, MA, EEUU), y tras tinción con hematoxilina/eosina. Antes de la tinción, las muestras se mantuvieron a 60°C durante 6-24 horas para fijar los tejidos al portaobjetos. Se desparafinaron incubándolas secuencialmente en xilol, etanol 100%, 70% y agua destilada. Tras la tinción, las muestras se deshidrataron y montaron con resina DPX (una mezcla de distireno, plastificante y xilol). Se utilizaron dos secciones histológicas de cada ratón de un total de 5 ratones por grupo experimental y 3 secciones por cada conejo de un

total de 2-4 conejos por grupo experimental. Todas las evaluaciones de las muestras fueron analizadas por 3 observadores independientes.

3.2.1.3.1 Hueso de nueva formación

El porcentaje de área de cada campo que contenía tejido conectivo mesenquimal (identificado con tinción de Masson) fue cuantificado utilizando el programa informático Image-Pro Plus 5.0 (Media Cybernetics, EEUU) en un área de 1.9 mm^2 desde la placa de crecimiento. En esta tinción se puede observar el hueso decalcificado en azul, los hematíes en rojo, los citoplasmas celulares en rosa o rojo y los núcleos en azul oscuro.

3.2.1.3.2 Osteoblastos y adipocitos

El número de osteoblastos, células de aspecto cuboidal en zonas de nueva formación ósea y en las superficies endostales, fue cuantificado en un área de 2.8 mm^2 desde la placa de crecimiento de la tibia en regeneración. Además, se cuantificó el número de adipocitos en un área (1.9 mm^2) comprendida entre la diáfisis media y la metáfisis distal. Como la grasa intracelular fue eliminada durante el procesamiento histológico de las muestras, los adipocitos fueron identificados como espacios redondeados no teñidos en la medula ósea (en algunas casos se confirmó con la tinción de S-100, descrito en el apartado de inmunohistoquímica).

3.2.1.3.3 Vasos sanguíneos

La presencia de vasos sanguíneos fue cuantificada en la misma zona que los osteoblastos como células sanguíneas en el lumen. El número de vasos sanguíneos fue confirmado mediante la tinción con lectina, una isolectina procedente de la planta *Bandeiraea simplicifolia* conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) (L5391, Sigma-Aldrich), que presenta afinidad por el glicocálix del endotelio vascular de ratón (219). Para ello, se inactivó primero la actividad peroxidasa endógena con H_2O_2 al 3% en TSF (15 min) y a continuación con la isolectina ($1 \mu\text{g}/2.5 \text{ mm}^2$) durante 1 hora a temperatura ambiente. Como cromógeno se utilizó 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Vector Laboratories, Burlingame, CA) y se contrastaron las muestras con hematoxilina

3.2.1.3.4 Inmunohistoquímica

Los cortes histológicos obtenidos de las muestras óseas fueron desparafinados y rehidratados.

En los cortes procedentes de la tibia del ratón, en algunos casos se realizó primero una recuperación antigénica (ver tabla 2). A continuación, se bloquearon las interacciones inespecíficas y se incubó con el anticuerpo primario correspondiente. Tras inactivar la peroxidasa endógena con H_2O_2 al 3% en TSF (15 min), los cortes se lavaron e incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente. En los casos en que se utilizaron anticuerpos secundarios biotinilados para amplificar la señal, se realizó una incubación con el complejo estreptavidina-biotina-HRP (ABComplex, Dako, Glostrup, Dinamarca). Posteriormente se incubaron las muestras con el cromógeno DAB. Se incluyó siempre una muestra sin anticuerpo primario como control negativo. Las muestras fueron contrastadas con hematoxilina (Sigma-Aldrich).

Las células con positividad para TRAP se determinaron en 10-20 campos consecutivos en el área trabecular de la metafisis proximal. Se consideraron osteoclastos las células positivas para TRAP con 3 o más núcleos. Las células mononucleares positivas para TRAP se identificaron como precursores osteoclásticos (220). Los osteocitos positivos para esclerostina y los totales se cuantificaron en 4-6 campos aleatorios (magnificación, x400) en el segmento de hueso cortical comprendido entre la placa de crecimiento y la diáfisis media. El número de adipocitos positivos para S-100, identificados como estructuras redondas positivas para este anticuerpo sin células sanguíneas lumbales, se determinó en 4-6 campos aleatorios (x200 aumentos) en la diáfisis medio-distal.

En los cortes procedentes de fémures de conejo, se realizó el bloqueo y la permeabilización en albúmina sérica bovina en (4% en TSF con 0,1 % de Tritón X-100) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se utilizaron anticuerpos monoclonales frente a OC (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) (1:50), VEGF (Abcam, Cambridge, MA) (1:50), RAM11 (Dako) (1:50) y TRAP (Santa Cruz Biotechnology) (1:50), y un anticuerpo policlonal frente a esclerostina (R&D, Minneapolis, MN) (1:100). Los anticuerpos primarios se incubaron en una cámara húmeda durante toda la noche a 4°C, salvo en el caso de la esclerostina que fue incubada dos horas a temperatura ambiente. En todos los anticuerpos, menos en la esclerostina, se utilizó un anticuerpo secundario biotinado. Se incubó con el complejo Estreptavidina - Fosfatasa alcalina (dilución 1:200), durante 60 minutos a temperatura ambiente y de nuevo, se lavó con TSF 1X, tres veces, durante 5 minutos. En el caso de la esclerostina el anticuerpo secundario estaba unido a peroxidasa, que fue incubado durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizó el revelado mediante incubación con el sustrato cromogénico DAB durante 5-15 minutos. Se incluyó siempre una muestra sin anticuerpo primario como control negativo. Las muestras fueron

contrastadas con hematoxilina. Las células con positividad para los diferentes anticuerpos se determinaron en 10 campos próximos al material. En el caso de los osteocitos positivos para esclerostina, éstos se cuantificaron en 5 campos aleatorios en el hueso cortical.

Tabla 2. Condiciones experimentales de las técnicas inmunohistoquímicas en ratón.

Antígeno	Exposición antigénica / Incubación	Solución de bloqueo	Anticuerpo primario [dilución] / Incubación	Anticuerpo secundario [dilución] / Incubación
TRAP	Tripsina bovina 1%, pH 7.4 / 37°C, 30 min	Albúmina de suero bovino 1,25% + suero de cabra 2,5%	Policlonal de conejo (H00000054-D01P, Abnova) [1:300] / 24h, 4°C	Envision-Flex® (Dako) / 30 min, T/A
S100	<i>Target Retrieval Solution</i> , pH 6.5 (Dako) / 95°C, 20 min	No	Policlonal de cabra (RZ0311, Dako) [1:500] / 20 min, T/A	Envision-Flex® (Dako) / 30 min, T/A
Esclerostina	No	Suero de conejo 10%	Policlonal de cabra (AF1589, R&D, Minneapolis, MN EEUU) [1:100] / 2h, T/A	IgG de conejo anti-cabra- HRP [1:200] / 30 min, T/A

T/A: Temperatura ambiente.

3.2.1.3.5 Apoptosis

La apoptosis de los osteocitos *in vivo* se determinó con un ensayo de TUNEL (*TdT-mediated dUTP nick end labeling*) (FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit; QIA21, Calbiochem, Darmstadt, Alemania) (221). Esta técnica utiliza la enzima Klenow, una deoxinucleotidiltransferasa terminal sin actividad exonucleasa 5' → 3',

que incorpora un nucleótido dUTP asociado a biotina en los extremos 3' del ADN fragmentado. Posteriormente, se incubó la muestra con el complejo streptavidina-HRP y se reveló con DAB. Se incluyó una muestra incubada con DNAsa I y otra en la que se substituyó la Klenow por H₂O destilada. Las muestras fueron contrastadas con verde de metilo. Se cuantificaron los osteocitos apoptóticos y los no apoptóticos en el hueso cortical en 10-20 campos (magnificación, x400).

3.2.2 *Ex vivo e In vitro*

3.2.2.1 Proliferación y viabilidad celular

Para determinar la proliferación celular, las células no adheridas recogidas y mezcladas con las adheridas (después de una trispsinización suave) fueron teñidas con azul de tripán al 4% (1:1, v/v). El número total de células se contó en un hemocitómetro.

El crecimiento celular se analizó utilizando un ensayo estándar colorimétrico (*CellTiter 96[®] AQueous Assay*; Promega, Madison, WI). Del medio condicionado celular (2 ml) se pipetearon 100 µl en pocillos de una placa p96. A continuación, se añadió 20 µl de una solución que contenía 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) y el agente acoplador de electrones etosulfato de fenazina, que combinado con MTS forma una sal estable, incubando durante dos horas. Finalmente, se midió la absorbancia a 490 nm en un lector Opsys MR Reader (Dynex Technologies, Chantilly, VA).

3.2.2.2 Actividad de FA

La actividad de FA se analizó en extractos de proteína celular obtenidos con Triton X-100 al 1% utilizando p-nitrofenilfosfato como sustrato (176). Una unidad de actividad enzimática fue definida como nmoles de p-nitrofenol/min. La actividad de FA se normalizó con el contenido de proteína total determinada con el método de Bradford, utilizando ASB como estándar (Pierce, Rockford, IL).

Alternativamente, para la determinación de las colonias AF+ y las totales en los cultivos primarios de CMMO de ratón, éstas se fijaron con etanol 70% y, a continuación, las colonias positivas para AF se identificaron por tinción con un método estándar basado en la precipitación de una sal de diazonio (Fast Red Violet LB) en medio alcalino (pH 9,5), formada a partir del sustrato naftol AS-BI (Sigma-Aldrich). Las imágenes obtenidas tras escaneado de la placa se analizaron con el programa Adobe

Photoshop Cs8 para determinar el porcentaje de superficie teñida. El número total de colonias celulares en la placa de cultivo se analizó por tinción con cristal violeta (Sigma-Aldrich) (al 0,2% y 2% de etanol). Las placas se escanearon como se ha indicado o, alternativamente, el colorante se eluyó y se determinó la absorbancia a 540 nm.

3.2.2.3 Mineralización

Para determinar la mineralización en los cultivos celulares se utilizó la tinción de rojo de alizarina (176). Las células se fijaron con etanol 70% durante 1 hora y, a continuación, se añadió rojo de alizarina 40 mM, pH 4.2, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar las células con TSF y agua destilada, la tinción se eluyó con cloruro de cetilpiridinio al 10% en fosfato sódico 10 mM, pH 7.0, midiendo la absorbancia a 620 nm.

Alternativamente, la superficie total mineralizada se determinó tras tinción con rojo de alizarina y escaneado con el programa *Adobe Photoshop Cs8*, cuantificando el número y área de los nódulos de mineralización.

3.2.2.4 Adipogénesis

La formación de adipocitos en los CMMO a los 14 días de cultivo fue evaluada tras la tinción de Oil-Red de las células fijadas con un 4% de formaldehído. El reactivo Oil-Red-O (222) se preparó diluyendo una solución inicial (0,3 g de Oil Red-O en 100 ml de isopropanol) en agua destilada (6:4, v/v) y filtrándola. El número de adipocitos fue evaluado en 6 campos por pocillo bajo el microscopio, y la media de los mismos representa el número de adipocitos por campo.

3.2.2.5 Síntesis de colágeno

La síntesis de colágeno se analizó con un método estándar (*SircolTM collagen assay*, Biocolor, Newtownabbey, Irlanda del Norte) (223). Las células se levantaron de la monocapa raspando y resuspendiendo en TSF, se centrifugaron a 10.000g durante 10 minutos y se incubaron en ácido acético 0,5 M durante 30 minutos. El sobrenadante resultante se incubó en agitación con Rojo Sirio (que se une al colágeno tipo I y V) durante 30 minutos, midiendo la absorbancia a 540 nm. La cantidad de colágeno se determinó frente a una curva estándar de concentraciones conocidas de colágeno y se

normalizó por el contenido proteico celular como se ha descrito anteriormente en el apartado de actividad de FA.

3.2.2.6 Extracción de proteína para transferencia *Western*

Las células MC3T3-E1 se lisaron en un tampón que contenía: Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 1%, deoxicolato sódico al 1%, y SDS al 0,1%, con fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM y aprotinina 0.8 μ M. El contenido proteico se determinó por el método de Bradford, como se ha indicado anteriormente. Los extractos proteicos celulares (50 μ g de proteína) fueron separados en geles de poliacrilamida al 12,5% en presencia de SDS bajo condiciones reductoras. A continuación, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare, Buckinghamshire, RU), que se bloquearon durante 1 h a 37°C con leche descremada al 5% en Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 con Tween-20 al 0,05%. A continuación, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos policlonales de conejo: anti-PTHrP (Ab-IV, Covance, Berkeley, CA) (dilución 1:1.000) o anti-PTHrP C6 (dilución 1:2.500) (224). Como control de carga se utilizó un anticuerpo anti- β actina (1:1.000) (Santa Cruz Biotechnology). Las membranas se incubaron con una IgG anti-conejo conjugada con HRP durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se reveló por quimioluminiscencia (Sistema ECL, GE Healthcare). Las bandas correspondientes fueron cuantificadas por densitometría.

3.2.2.7 Aislamiento de ARN total y PCR cuantitativa a tiempo real

El ARN total del homegeneizado de las muestras óseas o de los cultivos celulares fue extraído siguiendo un método estándar (Trizol; Invitrogen, Groningen, Holanda). La síntesis de ADNc se realizó utilizando oligonucleótidos aleatorios y la transcriptasa inversa modificada MMLV (Superscript II, Life Technologies, Rockville, MD), durante 2 horas a 37°C. La PCR a tiempo real se realizó con el ADNc resultante utilizando el sistema ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA) (176,214), con una polimerasa activada por calor TaqDNA (Amplitaq Gold, Applied Biosystems) y cebadores específicos de ratón de: Runx2, OSX, OC, OPG, FA, PPAR γ -2, aP-2, RANKL, PTHrP, PTHR1, SOST, VEGF y sus receptores (VEGFR-1 y VEGFR-2) y sondas TaqMan MGB específicas (*Assay-by-Design*SM; Applied Biosystems). Tras una incubación inicial de 2 minutos a 50°C y 10 minutos a 95°C, las muestras se sometieron a 50 ciclos de: 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 60 segundos. Los resultados se expresaron como niveles de expresión de cada gen

(una vez normalizados frente a los del 18S como gen constitutivo) en cada condición experimental, respecto al control correspondiente: $2^{-\Delta Ct}$, donde Ct representa el ciclo umbral de PCR en el cual el programa detecta por primera vez un incremento apreciable de la fluorescencia sobre la señal basal. $\Delta Ct = Ct \text{ (gen de interés)} - Ct \text{ (control endógeno, 18S)}$. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

3.2.3 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media (EEM). La comparación no paramétrica entre dos muestras se realizó por la prueba de Mann Whitney. Se utilizó ANOVA no paramétrica para comparar varias muestras (Kruskal-Wallis), seguido de una prueba post-hoc (Dunn). En el caso de los cultivos primarios de CMMO, los ratones fueron analizados de forma independiente y los resultados fueron agrupados para su análisis estadístico. Todos los valores con $p < 0,05$ fueron considerados significativos.

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Efecto de la PTHrP (107-139) en un modelo de regeneración ósea en ratón con bajo remodelado óseo (DM tipo 1).

Al comienzo de las inyecciones de STZ o el vehículo, el valor medio (\pm EEM) de los pesos corporales de los ratones incluidos en el estudio fue de $37,1 \pm 1$ g. Al final del estudio, los ratones diabéticos mostraron hiperglucemia y una disminución significativa del peso corporal comparados con el grupo control (Fig. 8A y B). Con la finalidad de confirmar el efecto de la diabetes en la masa y estructura ósea se analizó el fémur intacto de estos animales y de su grupo control *noT*. Se observó una disminución del % BV/TV, BS, Tb.Th, Tb.N así como del DA en el área trabecular de las metáfisis femorales de los ratones diabéticos, así como un aumento del Tb.Pf y del SMI en comparación con los controles (Tabla 3 y Fig. 8C), por el contrario no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros estudiados en el hueso cortical (Tabla 4). Además, se determinó la DMO del fémur y la tibia de estos ratones (Tabla 5). La diabetes indujo una disminución significativa de la DMO y de la CMO y un aumento del porcentaje de grasa en ambos huesos. Estas alteraciones en el fémur intacto de los ratones diabéticos se asociaron a una disminución significativa de la expresión génica de OSX y de OC, así como de la PTHrP y del VEGF y de la relación OPG/RANKL, y a un aumento de PPAR γ 2 (marcador adipocítico) (113) (Fig. 9). Inesperadamente, encontramos una disminución de la expresión génica de SOST (gen de la esclerostina) en el fémur de estos ratones.

Tabla 3. Parámetros estructurales del hueso trabecular en la metáfisis del fémur intacto de ratones controles y diabéticos, tratados o no con PTHrP (107-139) o PTHrP (1-36) (como péptido anabólico control)

	Control	Diabetes (D)	D + PTHrP (107-139)	D+ PTHrP (1-36)
BV/TV (%)	18,25 \pm 1,03	9,75* \pm 1,05	12,43 ^a \pm 1,00	14,70 ^a \pm 1,08
BS (mm ²)	65,41 \pm 3,85	42,24** \pm 4,1	51,93 ^a \pm 4,55	53,96 ^a \pm 2,43
Tb.Th (mm)	0,07 \pm 0,001	0,06** \pm 0,003	0,06 \pm 0,003	0,08 ^b \pm 0,001
Tb.N (mm ⁻¹)	2,55 \pm 0,17	1,75** \pm 0,27	2,43 ^a \pm 0,18	2,64 ^b \pm 0,22
Tb.Pf (mm ⁻¹)	14,60 \pm 0,59	22,99** \pm 1,50	20,07 ^a \pm 1,07	18,89 ^a \pm 1,32
SMI	1,66 \pm 0,03	2,06* \pm 0,08	1,81 ^a \pm 0,05	1,73 ^a \pm 0,06
DA	3,78 \pm 0,31	2,54* \pm 0,21	2,75 ^a \pm 0,03	2,70 \pm 0,03

BV/TV, porcentaje de volumen óseo; BS, superficie ósea; Tb.Th, espesor trabecular; Tb.N, número de trabéculas; Tb.Pf, factor de patrón de hueso trabecular; SMI, índice de estructura del modelo; DA, grado de anisotropía. Los valores son medias \pm EEM de 5 animales por grupo. *p<0,05; **p<0,01 vs control. a p<0,05; b p<0,01 vs D.

A continuación, se estudiaron los efectos inducidos por la diabetes sobre la regeneración ósea en estos animales utilizando un modelo bien caracterizado de ablación de médula ósea (191,193). De acuerdo con resultados previos en este modelo animal, a los 6 días tras la ablación medular se observó el reemplazo de la mayor parte del hematoma por hueso de nueva formación en la tibia de los ratones controles, evidenciado por la aparición de abundantes células osteoblásticas y osteoide en la metáfisis de la tibia. Por otro lado, también de acuerdo con resultados previos (191), se observó que los ratones diabéticos poseían un menor número de éstas células y un menor porcentaje de hueso de nueva formación (Fig. 10A), como se puede observar en las imágenes (Fig. 10B). Además, la diabetes indujo una disminución del número de vasos sanguíneos presentes en la zona de neoformación ósea (Fig. 11A). Por el contrario, se observó un aumento significativo del número de adipocitos en la región media-distal de la diáfisis de la tibia en regeneración de los ratones diabéticos (tinción de S-100) (Fig. 11B y C).

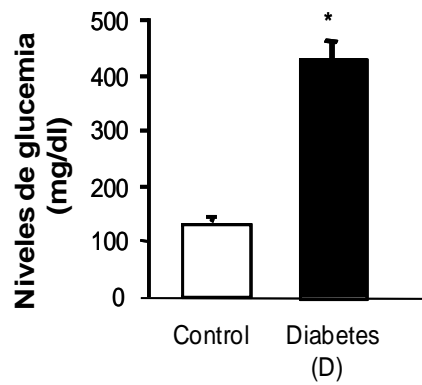
Tabla 4. Parámetros estructurales del hueso cortical en el fémur intacto de ratones controles y diabéticos, tratados o no con PTHrP (107-139) o PTHrP (1-36) (como péptido anabólico control)

	Control	Diabetes (D)	D + PTHrP(107-139)	D+ PTHrP(1-36)
Ct.Th (mm)	0,145 ± 0,003	0,142 ± 0,002	0,142 ± 0,001	0,141 ± 0,002
B.Ar (mm²)	1,040 ± 0,001	1,026 ± 0,010	1,045 ± 0,002	0,979 ± 0,006
MMI (mm⁴)	1,009 ± 0,090	1,053 ± 0,015	1,012 ± 0,062	1,051 ± 0,160
Po (%)	0,185 ± 0,001	0,196 ± 0,016	0,205 ± 0,004	0,194 ± 0,017

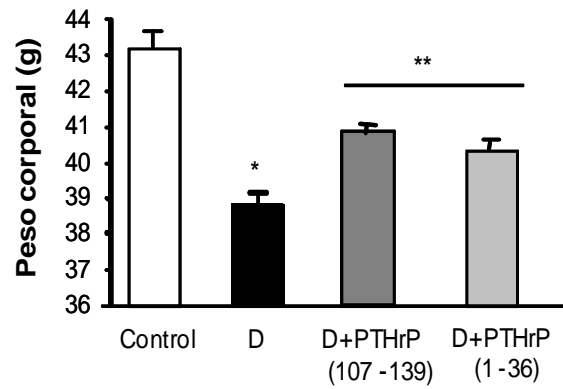
Ct.Th, espesor cortical; B.Ar, área de hueso cortical; MMI, momento medio de inercia; Po, porosidad. Los valores son medias ± EEM de 5 animales por grupo.

Además, la diabetes indujo una disminución del número de osteoclastos maduros (polinucleares) a expensas de un aumento de sus precursores mononucleares en la región metafisaria de la tibia en regeneración (Fig. 11D). En concordancia con la disminución de los niveles de SOST en el fémur intacto de los ratones diabéticos, encontramos una disminución del número de osteocitos totales y positivos para esclerostina en el hueso cortical de la tibia en regeneración en esta situación (Fig. 12A). Con la finalidad de dilucidar si esta disminución en el número de osteocitos estaba relacionada con la apoptosis, se analizó ésta con TUNEL. Se observó que los ratones diabéticos presentaban un mayor porcentaje de osteocitos apoptóticos que los controles (Fig. 12B).

A



B



C

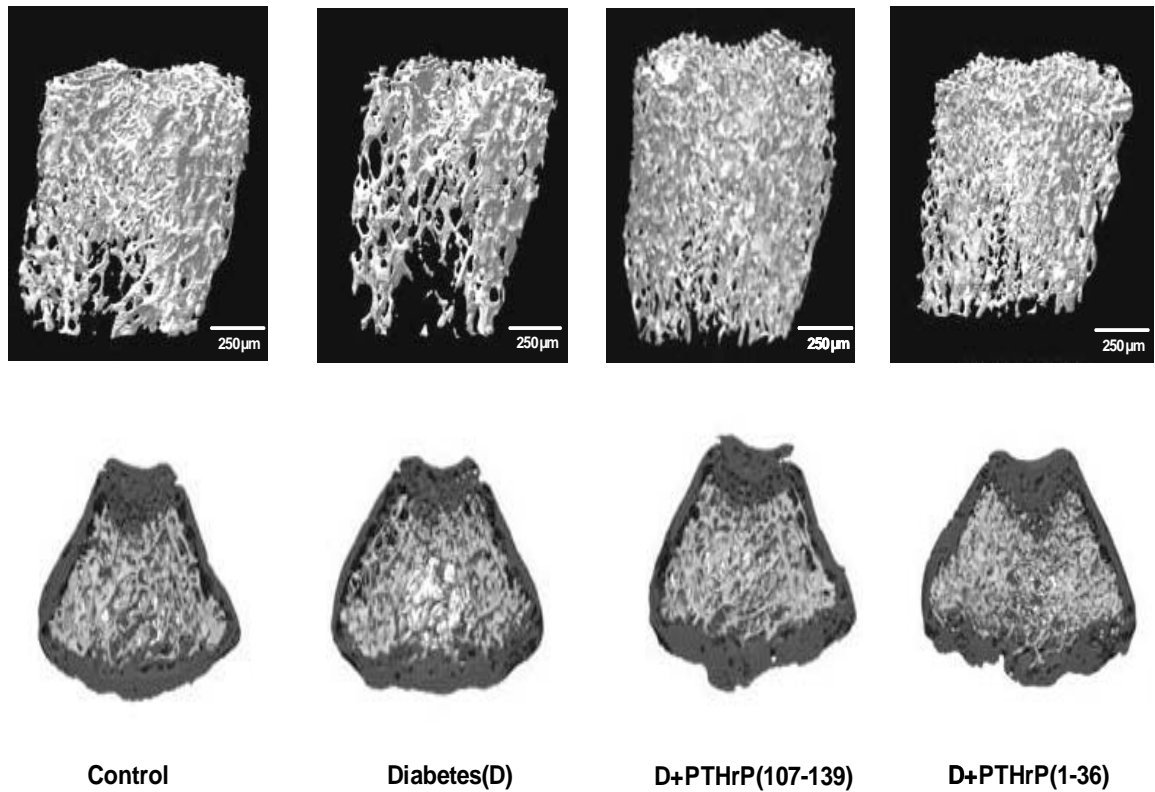


Figura 8. (A) Niveles de glucemia (mg/dl) (A) y peso (g) (B) de los ratones controles y diabéticos, tratados o no con PTHrP (107-139) o PTHrP (1-36) (como péptido anabólico control). Los resultados son medias \pm EEM de cada uno de los grupos experimentales ($n=5-10$). * $p<0,05$ vs control; ** $p<0,05$ vs D. (C) Imágenes representativas de μ CT de las áreas trabeculares del fémur distal en los diferentes grupos de estudio.

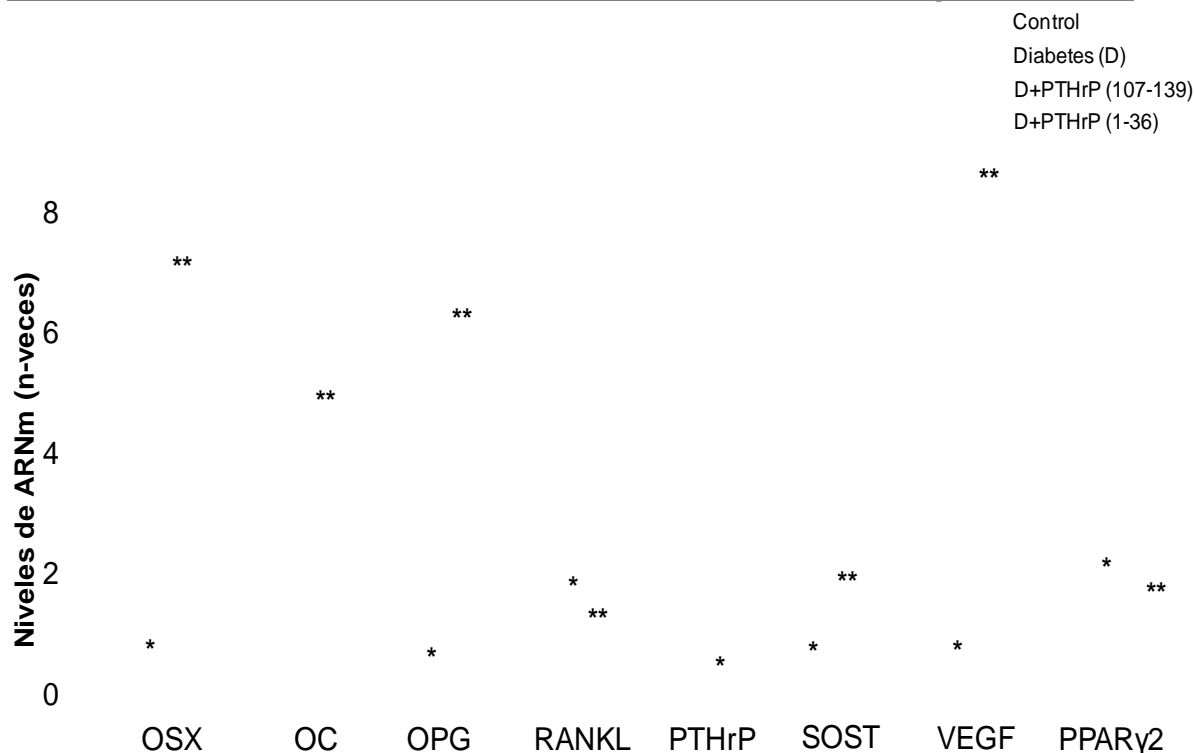


Figura 9. Expresión génica (analizada por PCR a tiempo real) de diferentes factores óseos en el fémur intacto de los ratones controles o diabéticos, tratados o no con PTHrP (107-139) o PTHrP (1-36) (como péptido anabólico control). Los resultados son medias \pm EEM de 5-10 ratones por grupo experimental. * $p < 0,05$ vs control; ** $p < 0,05$ vs D.

A continuación, evaluamos la expresión génica del sistema PTHrP/PTHR1 junto con algunos de los marcadores implicados en la diferenciación osteoblástica, así como de PPAR γ 2 y aP-2 (111) durante la formación ósea posterior a la ablación de médula ósea de la tibia en ambos tipos de animales. Considerando la relación entre la diabetes y las alteraciones vasculares, así como entre la angiogénesis y la formación ósea (225), decidimos examinar la expresión del VEGF y sus receptores en estos animales.

Tabla 4. Valores de masa ósea y contenido grasa en los huesos largos de ratones controles y diabéticos, tratados o no con PTHrP (107-139) o PTHrP (1-36) (como péptido anabólico control)

		Control	Diabetes (D)	D + PTHrP (107-139)	D+ PTHrP (1-36)
Fémur	DMO	0,118 \pm 0,0002	0,109* \pm 0,003	0,118** \pm 0,002	0,121** \pm 0,002
	CMO	0,045 \pm 0,0002	0,042 \pm 0,002	0,047** \pm 0,001	0,047** \pm 0,002
	% Grasa	13,170 \pm 0,200	15,837* \pm 0,616	13,987** \pm 0,05	13,363** \pm 0,073
Tibia	DMO	0,070 \pm 0,001	0,067* \pm 0,0007	0,070** \pm 0,001	0,073** \pm 0,001
	CMO	0,044 \pm 0,001	0,040* \pm 0,0008	0,045** \pm 0,001	0,045** \pm 0,001
	% Grasa	15,910 \pm 0,31	16,883 \pm 0,698	15,113 \pm 0,011	15,405 \pm 0,016

DMO, densidad mineral ósea (g/cm²); CMO, contenido mineral óseo (g). Los valores son medias \pm EEM de 5 animales por grupo. * $p < 0,05$ control; ** $p < 0,05$ vs D.

Encontramos que la expresión de Runx2 –un marcador de diferenciación osteoblástica temprana, que además controla la diferenciación de los precursores hematopoyéticos durante el desarrollo óseo (226)-, así como de OSX y de OC –un marcador tardío de maduración osteoblástica- estaba significativamente disminuida en los ratones diabéticos (Fig. 6), de acuerdo con lo esperado (191).

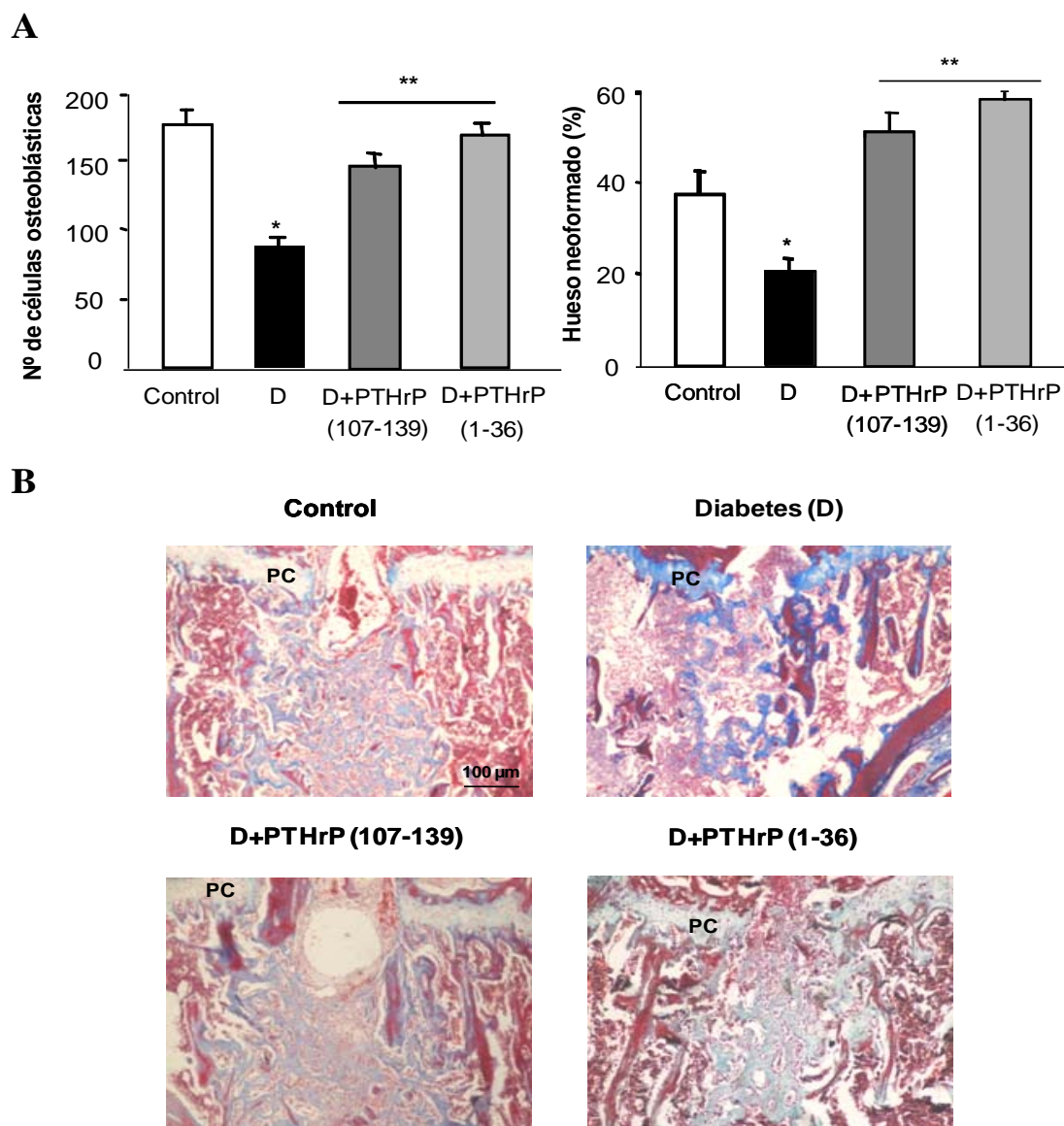


Figura 10. (A) Alteraciones en el número de células osteoblásticas y en el porcentaje de hueso neoformado (evaluado por Tinción de Masson) en la tibia en regeneración de los ratones controles y diabéticos, tratados o no con PTHrP (107-139) o PTHrP (1-36) (como péptido anabólico control). Los resultados son medias \pm EEM de cada uno de los grupos experimentales (n=5). *p<0,05 vs control; **p<0,05 vs D. (B) Imágenes representativas del hueso neoformado en las proximidades de la placa de crecimiento (PC) en la tibia de cada uno de los grupos de estudio.

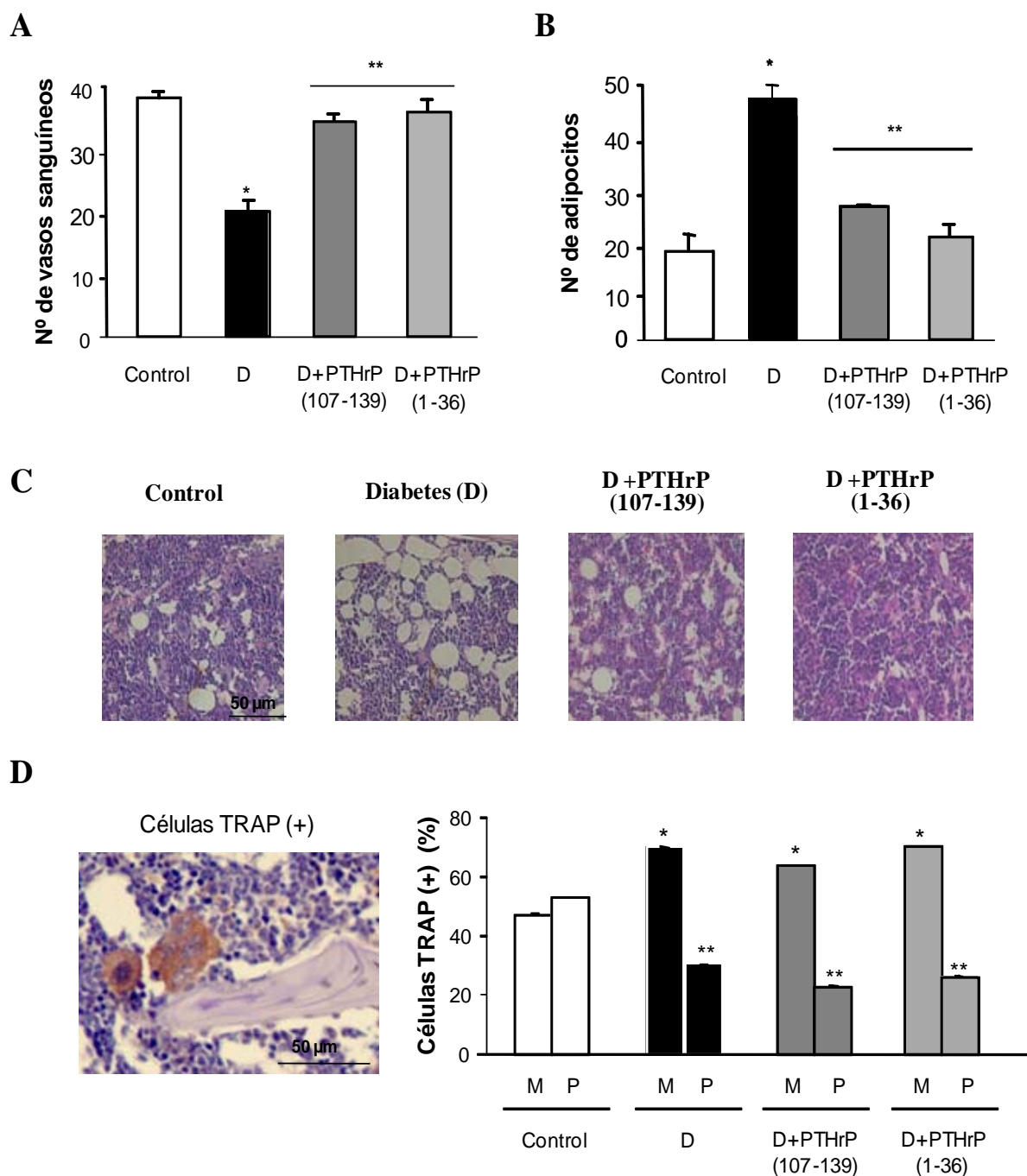


Figura 11. (A) Número de vasos sanguíneos presentes en la metáfisis de la tibia en regeneración de los ratones controles y diabéticos, tratados o no con PTHrP (107-139) o PTHrP (1-36) (como péptido anabólico control). (B) Número de adipocitos presentes en la diáfisis-medial de la tibia en regeneración de los grupos de estudio. (C) Imágenes representativas de los adipocitos en cada uno de los grupos experimentales. (D) Imagen representativa y cuantificación del número de osteoclastos polinucleados (P) y precursores mononucleares (M) con tinción positiva para TRAP en la metáfisis de la tibia en regeneración de cada uno de los grupos experimentales. Los resultados son medias \pm EEM de 5 ratones por grupo experimental. * $p < 0,05$ vs control respectivo; ** $p < 0,05$ vs diabético respectivo.

Por el contrario, en estos ratones se observó un aumento significativo de la expresión génica de FA así como de la relación RANKL/OPG, aumentando la expresión génica de RANKL y disminuyendo la de OPG (Fig. 13). Al mismo tiempo, se encontró una disminución de la expresión génica de la PTHrP y de su receptor PTHR1, así como del sistema VEGF y sus receptores, inducida por la diabetes (Fig. 13). Estos cambios se asociaron a un aumento significativo de los niveles de ARNm de PPAR γ 2 y aP-2 en los ratones diabéticos. Con el fin de descartar un posible efecto directo de la STZ en los precursores osteoblásticos en la tibia en regeneración, incubamos las células pluripotentes mesenquimales de ratón C3H10T1/2 en medio osteogénico con dosis elevadas de STZ (0,5 y 1 mg/ml) durante 10 días. No se encontraron efectos significativos de este compuesto en la expresión génica de OC, PTHrP y VEGF en estas células (Fig. 17A). El tratamiento con el fragmento C-terminal de la PTHrP en los ratones diabéticos revertió la disminución del peso total y las alteraciones histológicas (salvo en el caso de la TRAP, cuya tinción no varió) y estructurales observadas (Fig. 8 y 10-12); así como los cambios observados en la expresión génica de los marcadores estudiados, excepto la FA, cuya expresión aumentó (Fig. 13). Además, la administración de este péptido indujo efectos osteogénicos en el fémur intacto de los ratones diabéticos (Fig. 8 y 9; Tablas 3 y 5). Estas acciones de la PTHrP (107-139) fueron similares a las inducidas por la PTHrP (1-36) utilizada como péptido anabólico control (Fig. 8-13; Tabla 3 y 5).

En esta situación decidimos analizar directamente el efecto de la diabetes y su modulación por la PTHrP (107-139) utilizando CMMO aisladas de los huesos largos de los ratones diabéticos tratados o no con este péptido. En estos cultivos celulares procedentes de ratones diabéticos se observó una disminución del número total de colonias así como del número y diámetro de las positivas para FA a los 15 días de cultivo en comparación a los controles (Fig. 14A-C). De la misma forma, observamos una disminución del número y área de los nódulos de mineralización al día 21 de cultivo (Fig. 14D). El tratamiento con la PTHrP (107-139) revertió total o parcialmente estos efectos deletéreos en los ratones diabéticos (Fig. 18); Estas acciones del fragmento C-terminal de la PTHrP fueron similares a las inducidas por el fragmento N-terminal de la PTHrP (como péptido anabólico control) (Fig. 8-14; Tabla 3 y 5).

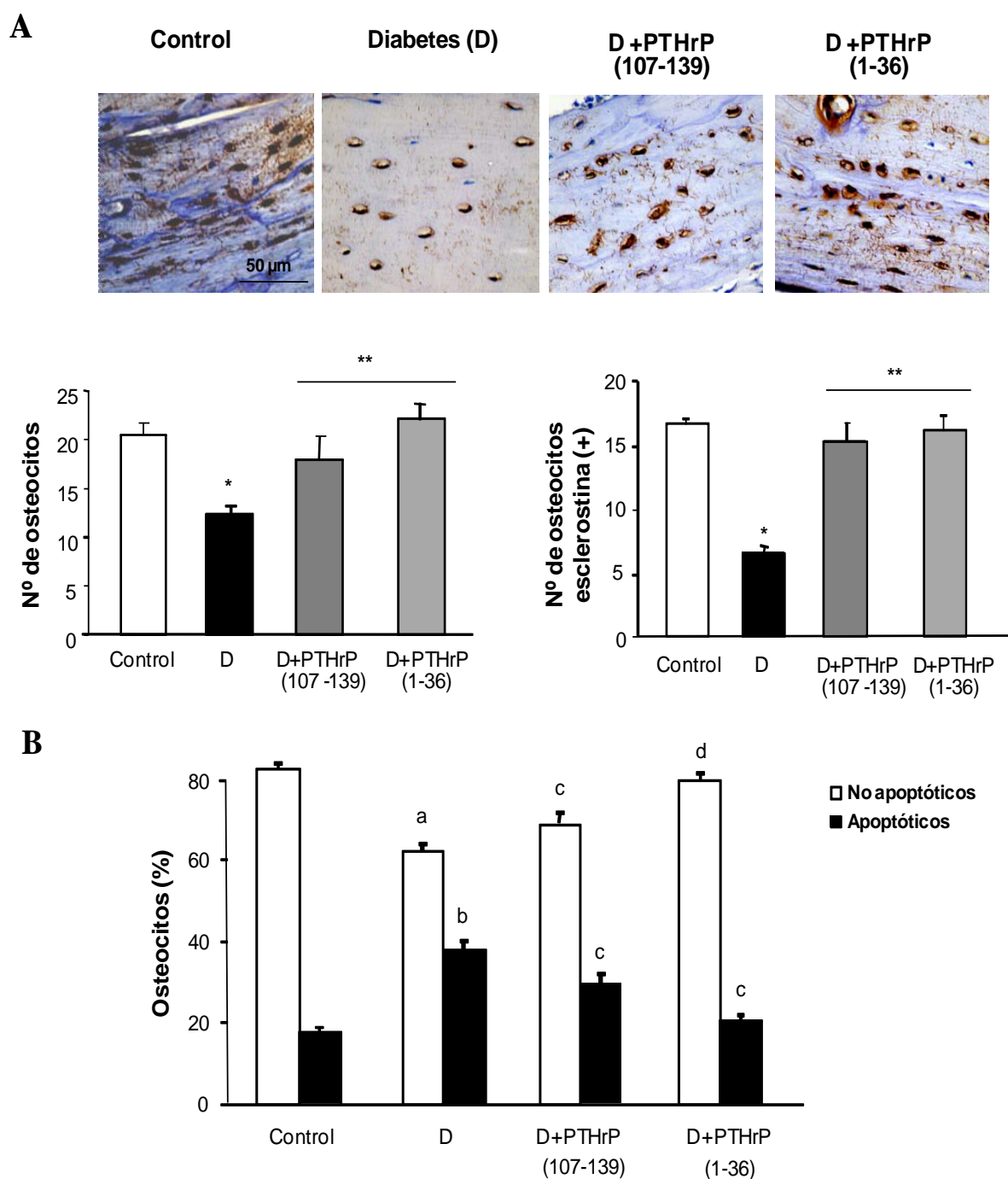


Figura 12. (A) Imágenes representativas de la inmunotinción de esclerostina en la tibia de los animales controles o diabéticos, tratados o no con PTHrP (107-139) o PTHrP (1-36) (como péptido anabólico control). Además, se muestra el número de osteocitos totales y/o positivos para esclerostina en el hueso cortical de la tibia de cada grupo. (B) Apoptosis de los osteocitos (analizada por TUNEL) del hueso cortical de la tibia en regeneración de cada uno de los grupos de estudio. Los resultados son medias \pm EEM de 4 ratones por cada uno de los grupos experimentales. * $p < 0,05$ vs control; ** $p < 0,05$ vs D. a $p < 0,05$; b $p < 0,01$ vs control respectivo; c $p < 0,05$; d $p < 0,01$ vs diabético correspondiente.

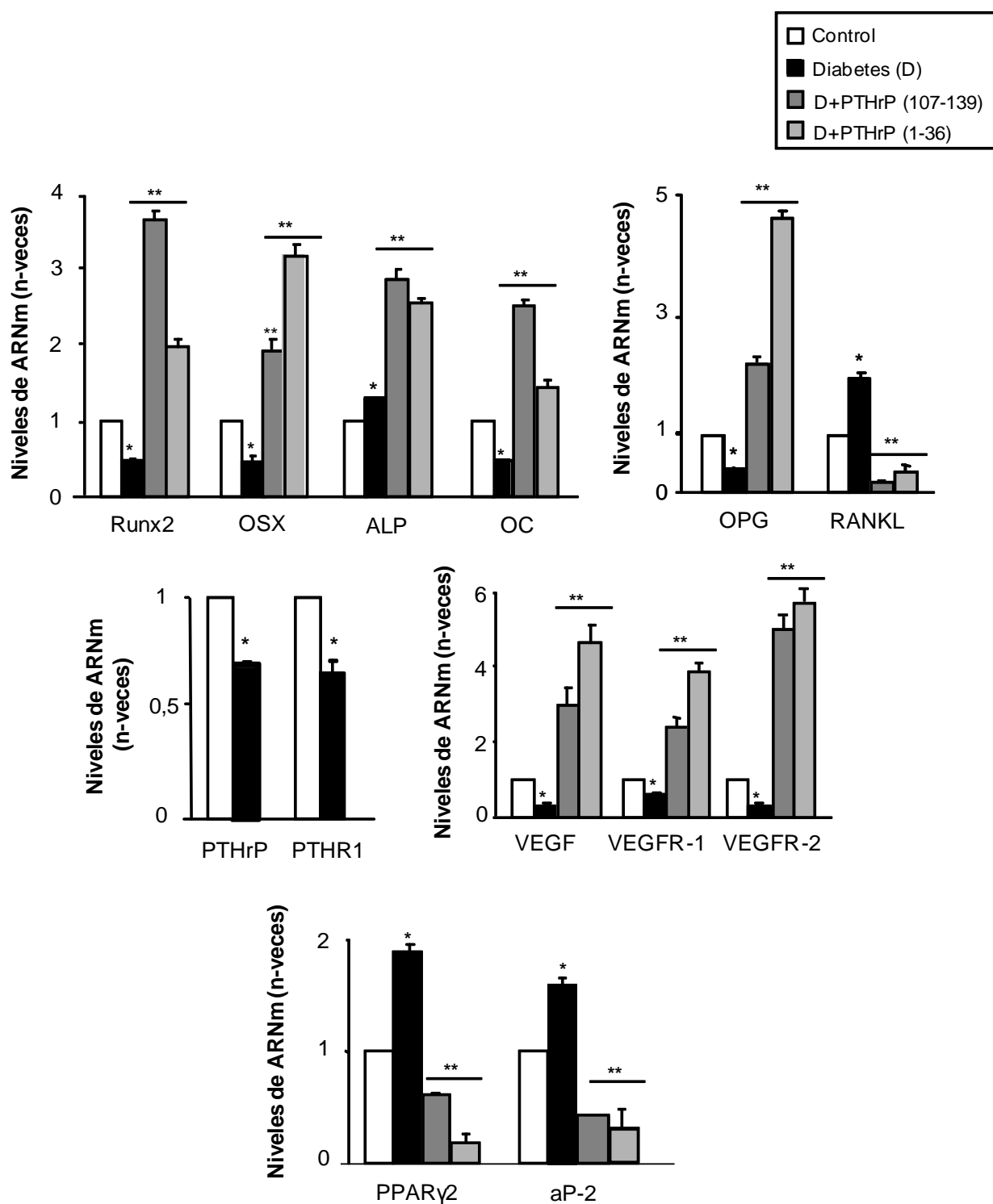


Figura 13. Expresión génica (analizada por PCR a tiempo real) de diferentes factores ósteoblásticos (Runx2, OSX, ALP, OC, OPG, RANKL, PTHrP/PTH1R), angiogénicos (VEGF y sus receptores, VEGFR-1 y VEGFR-2) y adipogénicos (PPARγ2 y aP-2) en la tibia en regeneración de los ratones controles o diabéticos, tratados o no con PTHrP (107-139) o PTHrP (1-36) (como péptido anabólico control). Los resultados son medias \pm EEM de 5 ratones por grupo experimental. *p<0,05 vs control; **p<0,05 vs D.

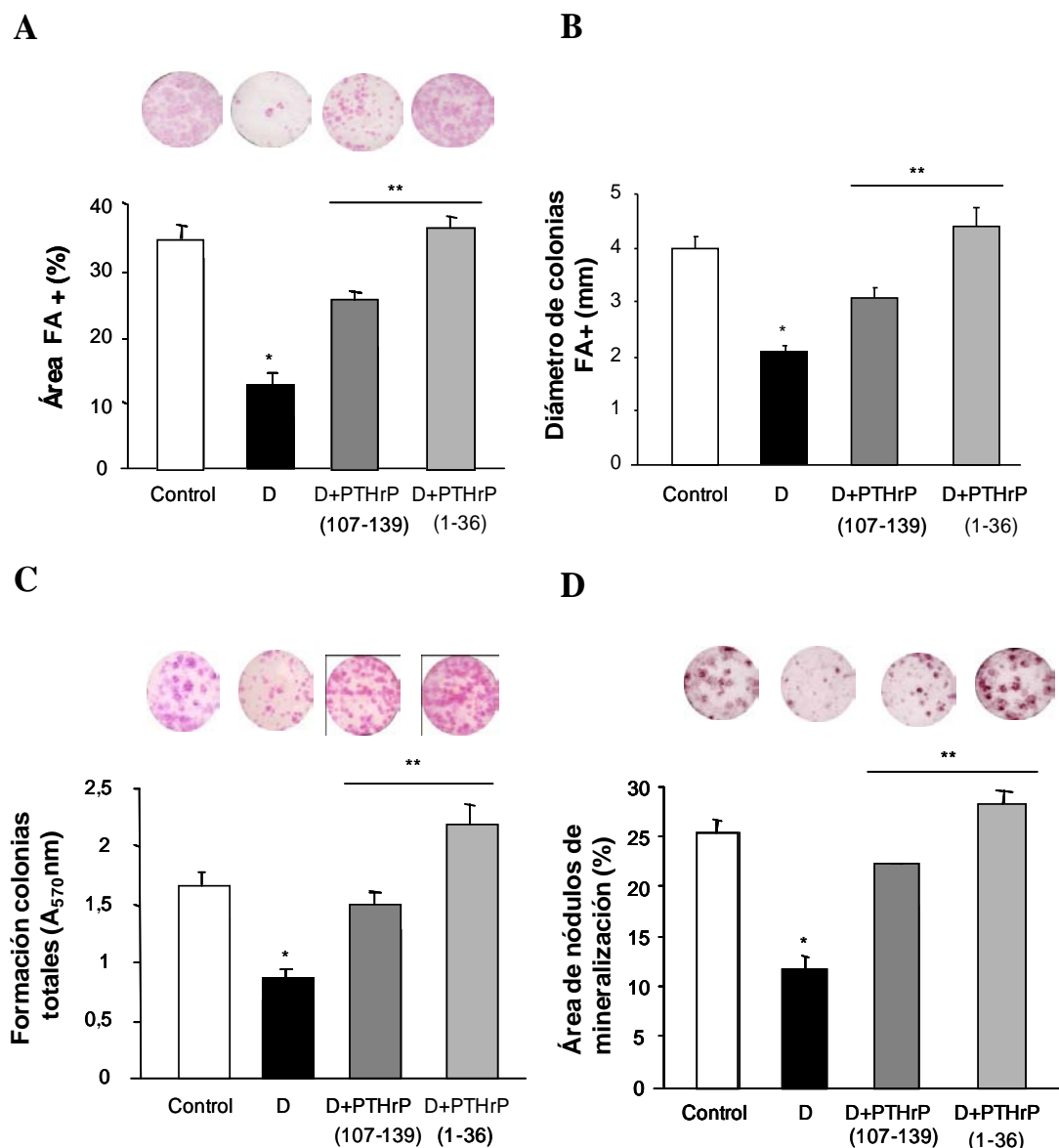


Figura 14. (A) Cambios en la formación y tamaño (B) de colonias positivas para FA, en la formación de colonias totales (tinción con cristal violeta) (C) y en la mineralización (tinción de rojo de alizarina) (D) en cultivos primarios de CMMO de los ratones controles o diabéticos, tratados o no con PTHrP (107-139) o PTHrP (1-36) (como péptido anabólico control) durante 15 o 21 días. Se muestran imágenes representativas de las colonias totales, FA+ y de los nódulos de mineralización. Los cultivos primarios de 5 ratones por grupo fueron analizados de forma independiente y los resultados se agruparon para el análisis estadístico. Los resultados son medias \pm EEM. * $p < 0,05$ vs control; ** $p < 0,05$ vs D.

4.2. Efecto de la PTHrP (107-139) en células osteoblásticas de diferente grado de diferenciación en medio de alta glucosa

A continuación, nos planteamos confirmar los efectos osteogénicos de la PTHrP (107-139) observados *in vivo*, utilizando CMMO obtenidas de los huesos largos de ratones controles incubadas en un medio con alta glucosa (25 mM).

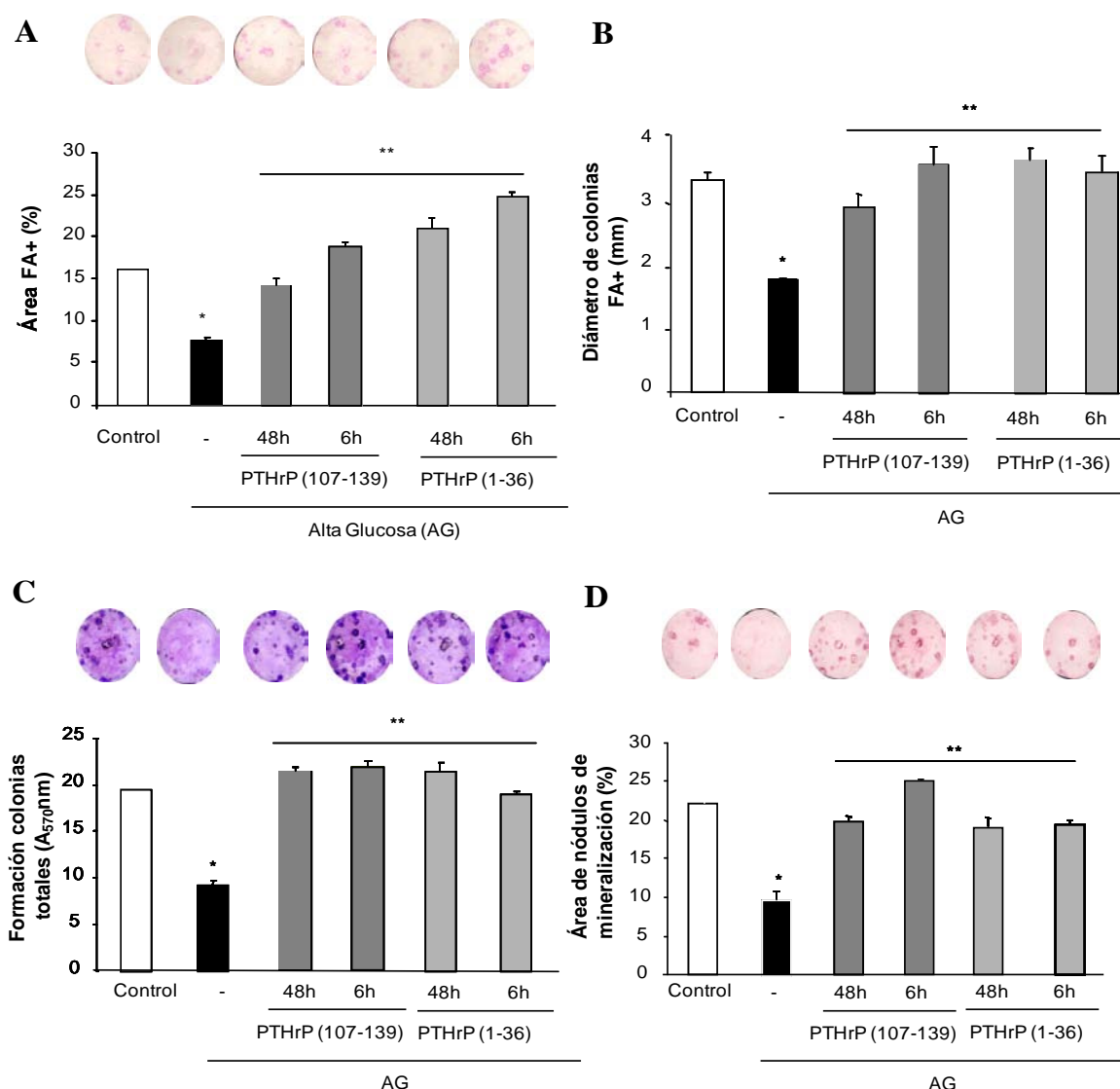


Figura 15. Cambios en la formación y tamaño (B) de colonias positivas para FA, en la formación de colonias totales (medidas por tinción con cristal violeta) (C) y en la mineralización (D) de cultivos primarios de CMMO de los ratones controles sembradas en medio normal o de alta glucosa (AG, 25 mM), estimuladas o no con PTHrP (107-139) o PTHrP (1-36) (como péptido anabólico control) (100 nM), de forma intermitente (6 h en ciclos de 48 h) o de forma continua, durante 15-21 días. Además, se muestran imágenes representativas de las colonias totales, FA+ y de los nódulos de mineralización. Los cultivos primarios de 5 ratones por grupo fueron analizados de forma independiente y los resultados fueron agrupados para el análisis estadístico. Los resultados son medias \pm EEM. * $p < 0,05$ vs control; ** $p < 0,05$ vs D.

En este contexto se encontró que el fragmento C-terminal de la PTHrP, a 100 nM, revertió las alteraciones en la formación de colonias totales y en la diferenciación osteogénica (número y diámetro de las colonias FA+ y en las mineralizadas) inducidas por la alta glucosa (Fig. 15). Además, la PTHrP (107-139) revertió los inducidos por la alta glucosa en la expresión génica de factores de diferenciación osteoblástica (PTHr1, Runx2 y OC) y adipogénica (aP-2 and PPAR γ 2) (Fig. 16A). Con la finalidad de confirmar el efecto proadipogénico de la alta glucosa en estos cultivos, las CMMO se mantuvieron en un medio adipogénico durante 15 días, observando un aumento del número de adipocitos por campo en presencia de alta glucosa, pero no en presencia

de la PTHrP (107-139) (Fig. 16B). El tratamiento intermitente (en periodos de 6 horas) con este péptido fue igual de eficiente que el tratamiento continuo cada 48 h (Figs. 15 y 16). En todos los casos, el fragmento N-terminal de la PTHrP reprodujo los efectos osteogénicos de la PTHrP (107-139) en estos cultivos (Figs. 14-16).

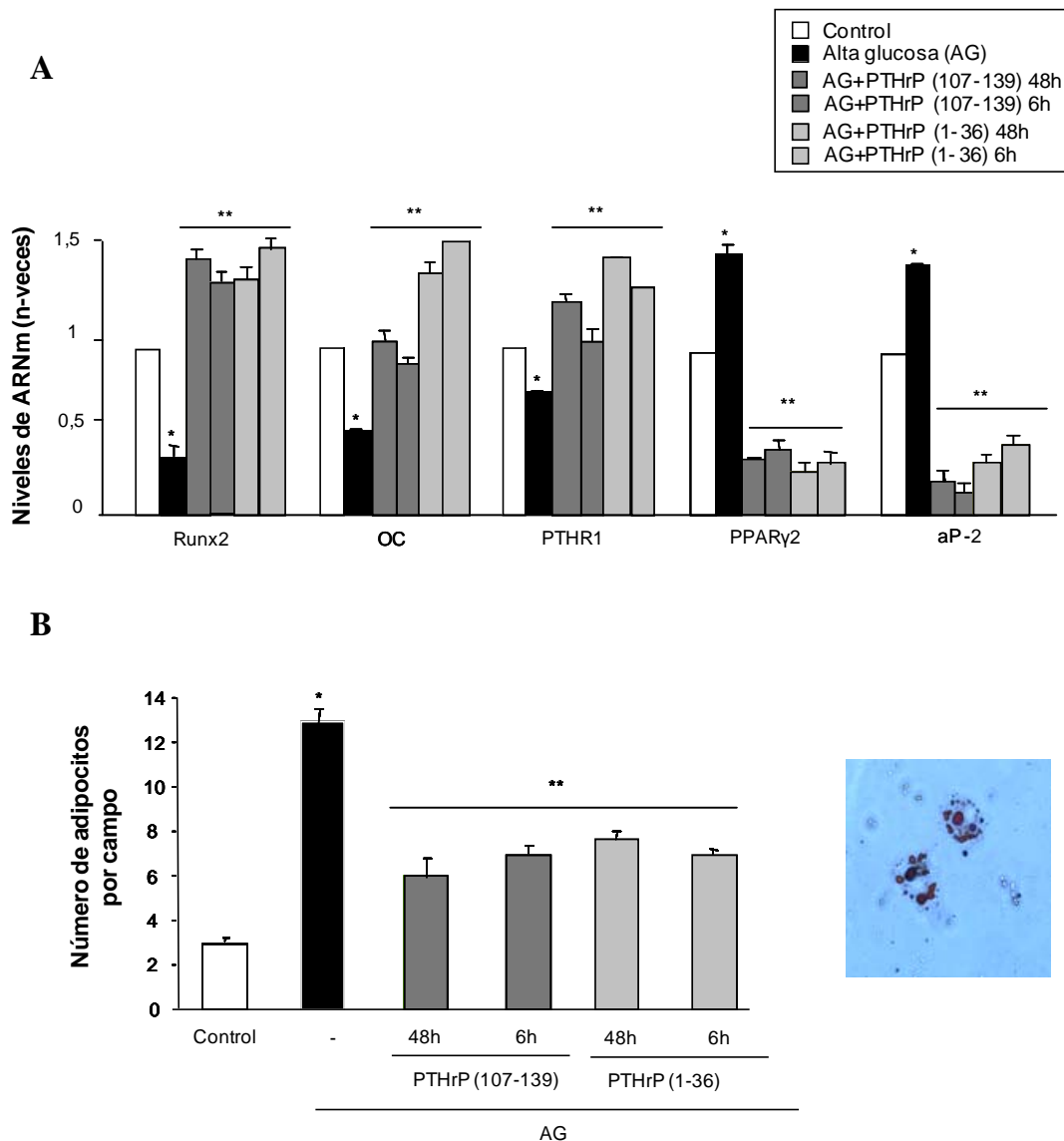


Figura 16. . (A) Cambios en la expresión génica (analizada por PCR a tiempo real) de diferentes factores osteoblásticos (Runx2, OC, PTHR1) y adipogénicos (PPAR γ 2 y aP-2) en CMMO de ratón, en presencia o ausencia de alta glucosa (AG, 25 mM) y estimuladas o no con PTHrP (107-139) o PTHrP (1-36) (como péptido anabólico control) (100 nM), de forma intermitente (6 h en ciclos de 48h) o continua durante 15 días. (B) Cambios en la formación de adipocitos en las CMMO en las mismas condiciones experimentales del apartado anterior. Se muestra una imagen representativa de los adipocitos. Los cultivos primarios de 3-4 ratones por grupo fueron analizados de forma independiente y los resultados se agruparon para el análisis estadístico. Los resultados son medias \pm EEM. * $p < 0,05$ vs control; ** $p < 0,05$ vs D

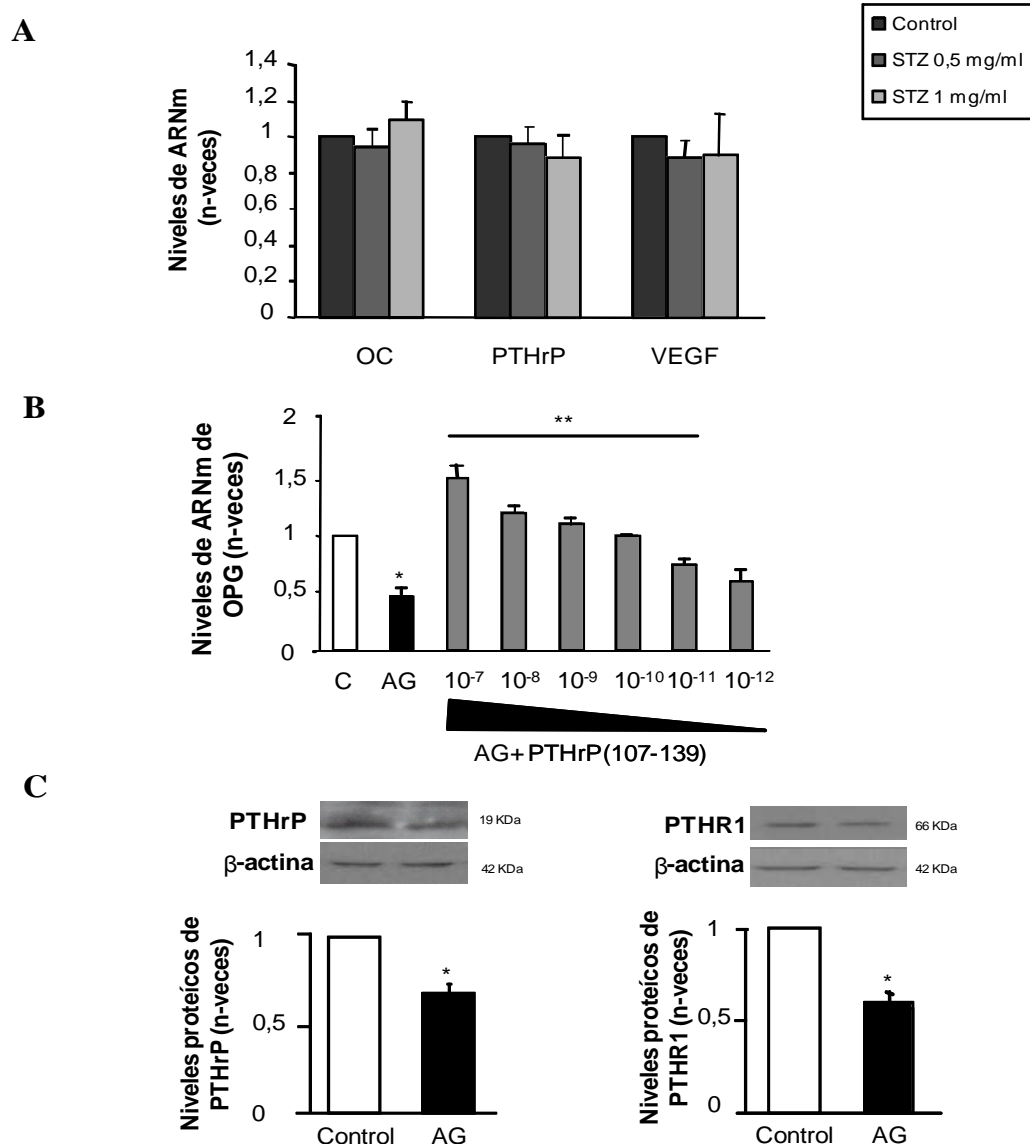


Figura 17 . (A) Expresión génica (analizada por PCR a tiempo real) de OC, PTHrP y VEGF en células mesenquimales de ratón C3H10T1/2 en presencia de dosis elevadas de STZ (0,5 y 1 mg/ml) durante 10 días. (B) Expresión génica (analizada por PCR a tiempo real) de OPG en células MC3T3-E1 crecidas en alta glucosa (AG, 25 mM) durante 5 días, en presencia o ausencia de PTHrP (107-139) a diferentes concentraciones (10^{-7} - 10^{-12} M). (C) Cambios en la expresión proteica de PTHrP y PTHR1 (analizados por transferencia *western*) en células MC3T3-E1, en presencia o ausencia de AG durante 5 días. Los resultados son medias \pm EEM de 3-4 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs control; ** $p < 0,05$ vs AG.

Además, quisimos comprobar estos efectos anabólicos de la PTHrP (107-139) utilizando células osteoblásticas de ratón MC3T3-E1 *in vitro*, un modelo celular ampliamente utilizado para estudiar los efectos anabólicos del dominio N-terminal común a la PTH y la PTHrP (227-229). La exposición de estas células a la elevada glucosa (25 mM) durante el crecimiento y la diferenciación celular en un medio osteogénico disminuyó significativamente la expresión génica de Runx2, OSX y OC, así como la relación OPG/RANKL sin variar la de FA (Fig. 18). Estos resultados se

acompañaron de una disminución de la expresión génica (y proteica) del sistema PTHrP/PTHr1 y del VEGF y sus receptores (Fig. 17C y 18). Estas alteraciones de la elevada glucosa fueron reproducidas con el tratamiento de estas células con la misma concentración de manitol (25 mM) (Fig. 18). La presencia de PTHrP (107-139), o el pentapéptido PTHrP (107-111), a 100 nM, en el medio con alta glucosa revertió la mayoría de las alteraciones observadas en los citados factores osteoblásticos por el medio hiperosmótico (Fig. 18). Además, el efecto osteogénico de este fragmento C-terminal de la PTHrP era dosis dependiente, siendo eficaz incluso a una concentración de 10 pM sobre la expresión génica de OPG (Fig. 17B).

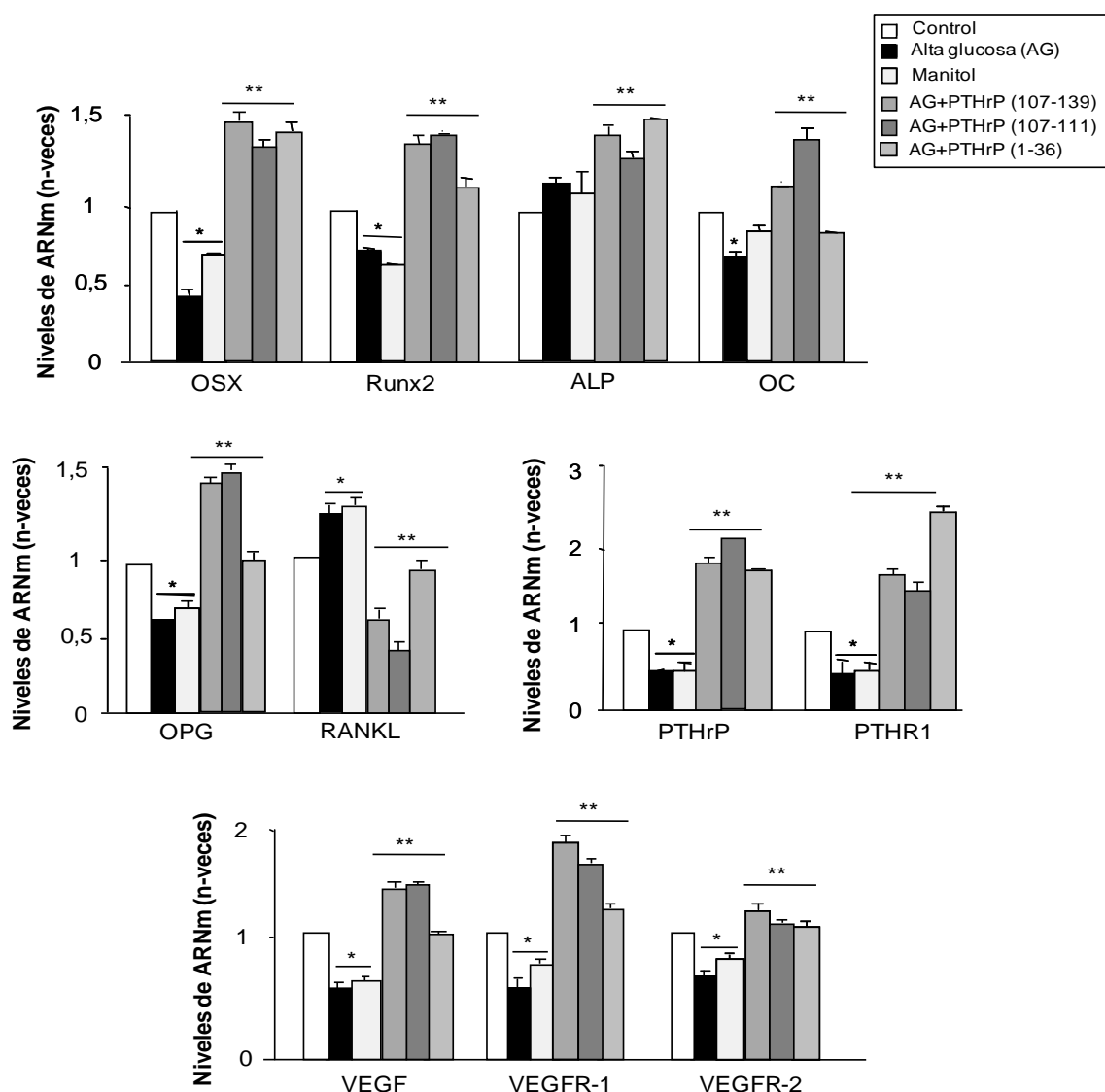


Figura 18. Expresión génica (analizada por PCR a tiempo real) de diferentes factores osteoblásticos (Runx2, OSX, ALP, OC, OPG, RANKL, PTHrP/PTH1R) y angiogénicos (VEGF y sus receptores, VEGFR-1 y VEGFR-2) en células MC3T3-E1 sometidas a alta glucosa (AG, 25 mM) (o manitol como control osmótico) durante 5 días, en presencia o ausencia de PTHrP (107-139), PTHrP (107-111) o PTHrP (1-36) (como péptido anabólico control) (100 nM). Los resultados son medias \pm EEM de 5 experimentos independientes. *p < 0,05 vs control; **p < 0,05 vs AG o manitol.

Por otro lado, no observamos alteraciones significativas en la mineralización, la actividad de FA o la secreción de colágeno por la alta glucosa o el manitol en estas células (Fig. 19B-D); aunque aumentaron con el tratamiento con la PTHrP (107-139) durante el período de estudio (5-15 días). Además, se observó una disminución en el número de células viables (por ensayo colorimétrico de viabilidad celular y exclusión de azul de tripán) provocada por la exposición continua a la alta glucosa en las células MC3T3-E1; un efecto que revertió por la PTHrP (107-139) (Fig. 19A). Se observaron efectos similares utilizando la PTHrP (1-36) como factor anabólico óseo bien caracterizado (Fig. 18 y 19).

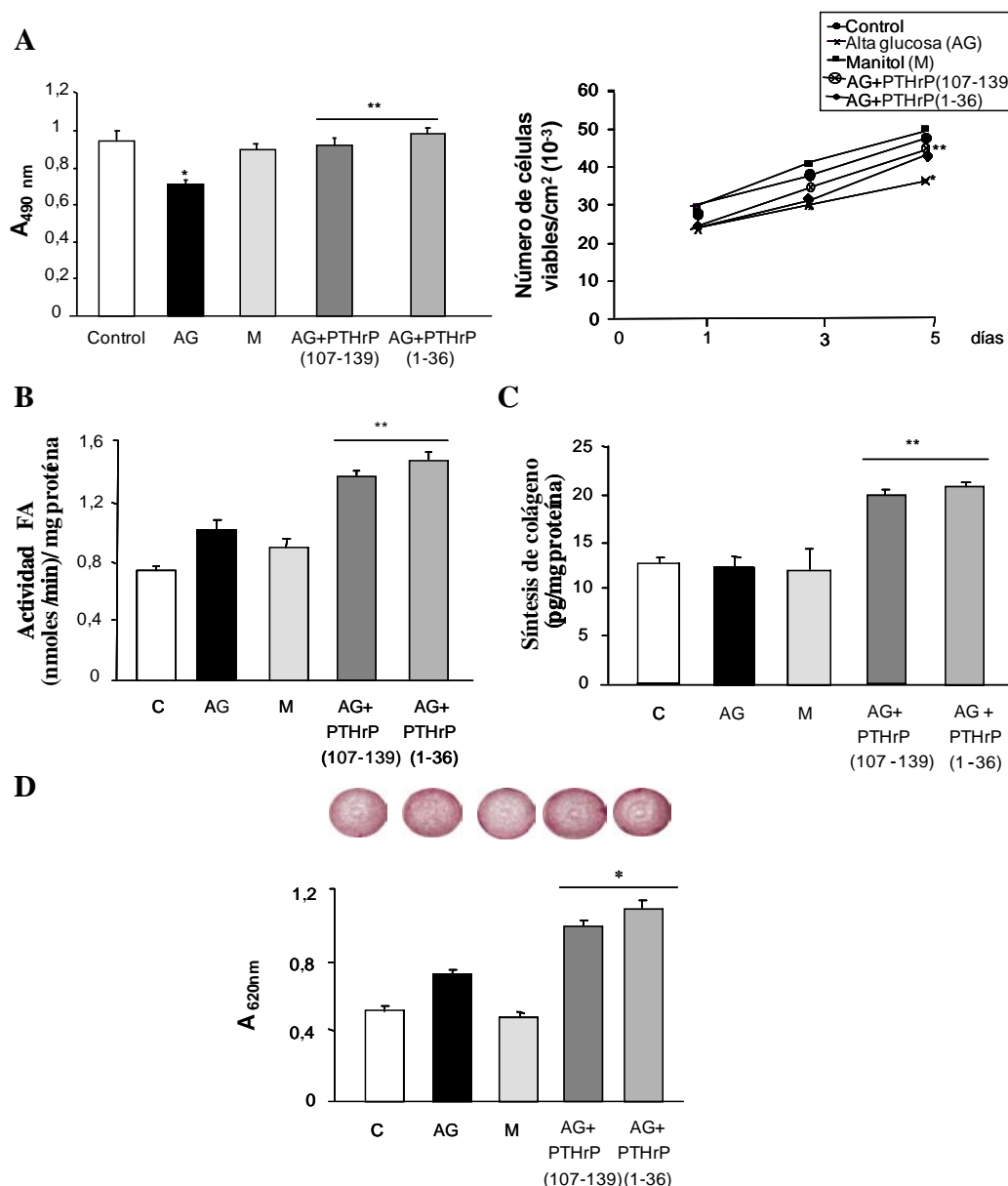


Figura 19. (A) Crecimiento (analizado por ensayo colorimétrico o azul de tripán a los 5 días) de las células MC3T3-E1 en medio de alta glucosa (AG, 25 mM) o manitol (control osmótico), en ausencia o en presencia de PTHrP (107-139) o PTHrP (1-36) (como péptido anabólico control) (100 nM). Actividad de FA (B) y síntesis de colágeno (C) a los 5 días de cultivo en medio de AG o manitol, con o sin PTHrP (107-139) o PTHrP (1-36). (D) Mineralización en las células MC3T3-E1 a los 15 días en los mismos grupos experimentales. Los resultados son medias \pm EEM de 3-4 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs control; ** $p < 0,05$ vs AG o manitol.

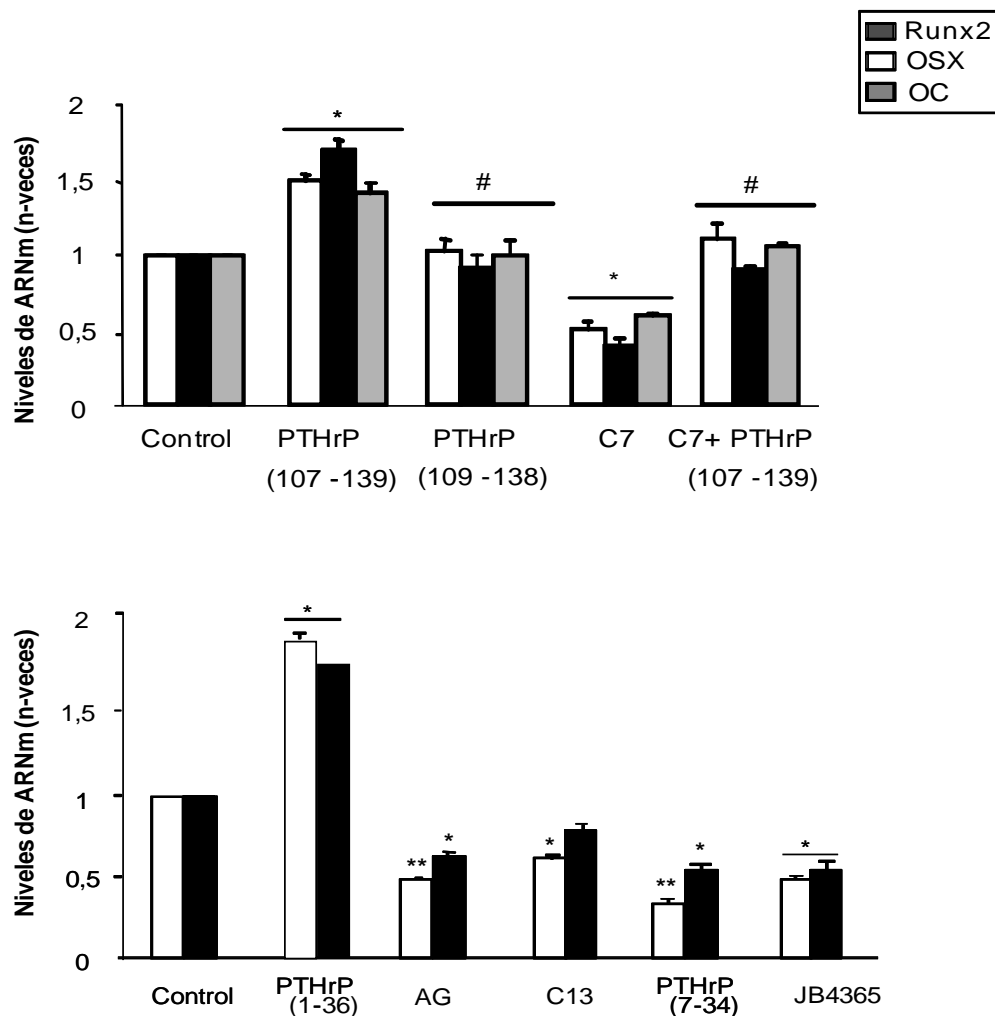


Figura 20. Efecto de la PTHrP endógena y exógena sobre la expresión génica (por PCR a tiempo real) de factores osteoblásticos en las células MC3T3-E1 crecidas en medio de glucosa normal durante 5 días. La PTHrP (107-139) y la PTHrP (109-138) se añadieron a 100 nM; los anticuerpos neutralizantes de la PTHrP (107-139) (C7) y PTHrP (1-36) (C13), a dilución 1:100. Los antagonistas del PTHR1, PTHrP (7-34) y JB4365 se añadieron a 1 μ M. Los resultados son medias \pm EEM de 5 experimentos independientes. AG, alta glucosa. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs control respectivo; # $p < 0,05$ vs PTHrP (107-139).

Es interesante señalar que una exposición crónica de las células MC3T3-E1 a un antisuero neutralizante de la PTHrP (107-139) (C7) en un medio con glucosa normal, inhibió el efecto osteogénico de la PTHrP (107-139) (a una concentración de 100 nM) sobre la expresión génica de OSX, OC y VEGF, mientras, como era de esperar (85), la PTHrP (109-138) fue ineficaz en estas condiciones (Fig. 20). Además una exposición crónica de estas células a un antisuero neutralizante de la PTHrP (1-36) [C13, dilución 1:100], a dos antagonistas del receptor PTH1R, el péptido PTHrP (7-34) (84,230) y el antagonista no peptídico JB4365 (214), cada uno a una concentración de 1 μ M, en un medio con glucosa normal, reprodujo los efectos del medio hiperosmótico en la expresión génica de los marcadores analizados (Fig. 20).

4.3. Efecto de la PTHrP (107-111) cargada en biocerámicas en células MC3T3-E1

En primer lugar, evaluamos la capacidad de los materiales de interés (SBA-15 y C8-SBA-15) cargados con la PTHrP (107-111) para captar y liberar el péptido al medio de cultivo. Encontramos que el SBA-15 y el C8-SBA-15 retuvieron el 82% y el 77%, respectivamente, del péptido (utilizando ^{125}I -[Tyr 116]PTHrP (107-115) como trazador según se ha indicado en Métodos) tras 24 horas de carga. Después de una incubación de 24 horas en medio de cultivo, los biomateriales cargados con PTHrP (107-111) liberaron un 81% y un 75% de media, respectivamente, del mismo (Fig. 21). A las 48 horas, estos valores fueron de 93% y 88%, respectivamente. Además, el material C8-SBA-15 retuvo 3-4 % más del péptido que el SBA-15 entre los días 5 y 8. A los 10-15 días, la liberación del péptido por parte del SBA-15 fue del 100%, mientras que el C8-SBA-15 todavía retuvo un 4% del mismo (Fig. 21 y Tabla 6).

Asumiendo que el mecanismo de liberación de la osteostatina era por difusión (231), y considerando la insolubilidad de la matriz de sílice a pH 7,4, la liberación seguiría un patrón de acuerdo con la ecuación de Noyes-Whitney (232, 233):

$$\frac{W_t}{W_0} = A(1 - \exp^{-k_1 t}) \quad (1)$$

W_t corresponde a la masa del péptido liberado al tiempo t ; W_0 representa la masa máxima inicial del péptido dentro de los poros; A es la máxima cantidad de péptido liberado; k_1 es la constante de liberación, que es independiente de la concentración de péptido e indica la accesibilidad del solvente y el coeficiente de difusión a través de los canales del material mesoporoso (233, 234-236).

En estas condiciones, observamos que la liberación del péptido es rápida durante las primeras 24 horas, llegando a una fase estacionaria a partir de las 48 horas, mostrando una desviación respecto al definido por la ecuación (1). Esta desviación, debida a factores tales como el volumen del péptido, la distorsión de los canales del mesoporo y/o la liberación de moléculas del péptido adsorbidas en la superficie externa del material, se resuelve con la introducción de un factor empírico δ en la ecuación (1) (237, 238):

$$\frac{W_t}{W_0} = A(1 - \exp^{-k_1 t})^\delta \quad (2)$$

Los valores de este factor van de 0 a 1 para los materiales que siguen una cinética de primer orden o que liberan el péptido desde la superficie externa del material. Ajustando los datos a este modelo semi-empírico de primer orden, se obtiene una curva de liberación se muestran en la tabla 6. De acuerdo con este modelo, δ nos da una idea del grado de fidelidad de esta aproximación. En el caso del material C8-SBA-15, δ es menor que en el caso del SBA-15, indicando que parte de las moléculas del péptido se liberan desde la superficie externa del material. Lo cual está de acuerdo con la funcionalización de C8-SBA-15 que dificulta el acceso del péptido al poro del mesoporoso. Además, parece que la liberación del péptido por parte del SBA-15 es más rápida que la del C8-SBA-15, indicando una mayor retención del mismo por este último.

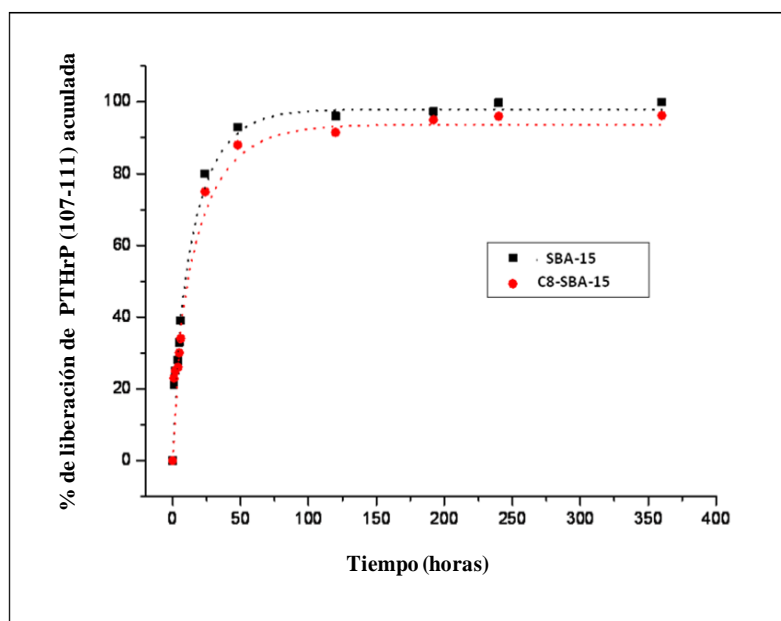


Figura 21. Perfil de liberación de la PTHrP (107-111) por los biomateriales SBA-15 y C8-SBA-15. Los puntos de la curva son medias de 3 medidas independientes por cada tiempo. Los valores del EEM (correspondientes a un coeficiente de variación <5% para cada punto) se han omitido para simplificar la representación de la gráfica.

Tabla 6. Parámetros cinéticos de la PTHrP (107-111) liberada por parte de los materiales SBA-15 y C8-SBA-15

Material	W_0 (μmol)	A (%)	$K \cdot 10^3$ (h^{-1})	δ
SBA-15	81,5	$98 \pm 1,8$	$46,9 \pm 9$	$0,63 \pm 0,08$
C8-SBA-15	77	$94 \pm 2,4$	$37,7 \pm 10$	$0,58 \pm 0,09$

W_0 , masa máxima inicial del péptido en los poros; A, máxima cantidad de péptido liberado; δ , factor empírico, cuyo rango varía entre 1 (materiales que siguen una cinética de primer orden) y 0 (materiales que inicialmente liberan las moléculas del péptido localizadas en la superficie térmica de los mismos).

A continuación, quisimos evaluar los efectos osteogénicos de la PTHrP (107-111) cargada en los biomateriales en cultivos de células MC3T3-E1. Encontramos que el biomaterial SBA-15 con el péptido incorporado aumentó el número de células viables (por exclusión de azul de tripán) respecto al material no cargado a los dos días de la siembra (Fig. 22 A y B). Esto se confirmó analizando el crecimiento celular (Fig. 22C). Además, este efecto también se observó al día 4, en el que menos del 10% de la PTHrP (107-111) cargada permanecía en el biomaterial (Fig. 21); incluso cuando se transfirió el biomaterial previamente incubado dos días con las células a un nuevo cultivo celular no expuesto anteriormente al mismo durante dos días más (Fig. 22A y B). Según la cinética de liberación del trazador, la cantidad de péptido liberado al medio por parte de los biomateriales cargados con la PTHrP (107-111) es aproximadamente de 75 nM y 1 nM, a los 2 y a los 4 días, respectivamente. Estas concentraciones son bioactivas, como se comprobó al añadir directamente PTHrP (107-111) sintética, en un rango de dosis de 0.1-100 nM, que aumentó significativamente el crecimiento celular en las MC3T3-E1 (Fig. 22D).

El biomaterial SBA-15 cargado con la PTHrP (107-111) también estimuló los niveles de ARNm de la FA (Fig. 23A), así como su actividad, y la síntesis de colágeno a los dos días en dichas células (Fig. 23B y C). Además, la expresión génica del VEGF, un potente factor angiogénico en el crecimiento y la reparación ósea que parece actuar coordinadamente con la PTHrP en los osteoblastos (176,188,225,239), aumentó en las células expuestas al biomaterial cargado con PTHrP (107-111) (Fig. 23). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en la expresión génica de OC y OPG, aunque sí una disminución de los niveles de expresión del

RANKL, indicando una relación OPG/RANKL aumentada por el biomaterial con el péptido (Fig. 23A).

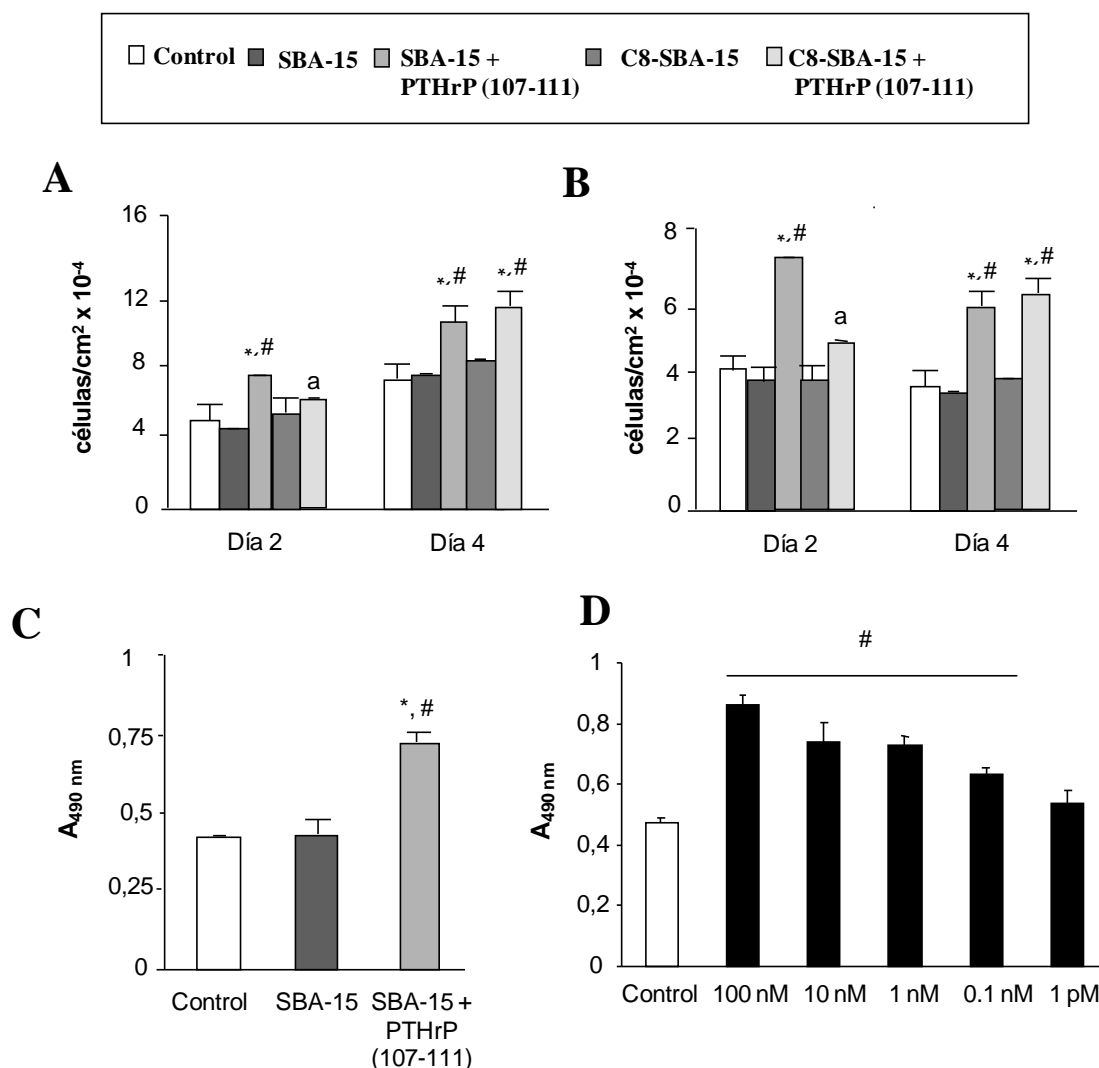


Figura 22. (A) Proliferación de las células MC3T3-E1 en presencia o no de SBA-15 o C8-SBA-15, cargados o sin cargar con PTHrP (107-111), a los 2 y 4 días de cultivo. (B) Proliferación de estas células en las mismas condiciones tras transferir los biomateriales a un cultivo no expuesto previamente a los mismos. (C) Viabilidad de las células MC3T3-E1 (como se describe en Material y Métodos) en presencia o ausencia de ambos tipos de biomateriales, cargados o no con PTHrP (107-111), a los 2 días de cultivo. (D) Dosis-respuesta del efecto de la PTHrP (107-111) sintética sobre la viabilidad de estas células. Los resultados son medias \pm EEM de 4-5 experimentos independientes por triplicado. # $p < 0,05$ vs control; * $p < 0,05$ vs material sin cargar correspondiente; a $p < 0,05$ vs SBA-15 cargado con PTHrP (107-111).

El biomaterial C8-SBA-15 cargado con la osteostatina indujo efectos similares a los observados con el biomaterial sin funcionalizar sobre el crecimiento celular (Fig. 22) y en la expresión de varios factores osteoblásticos hasta el día 8 de cultivo en las células MCT3T3-E1 (Fig. 23 y 24). Sin embargo, la expresión génica de OC y OPG también aumentó en presencia de este material funcionalizado cargado con la PTHrP (107-111) (Fig. 24).

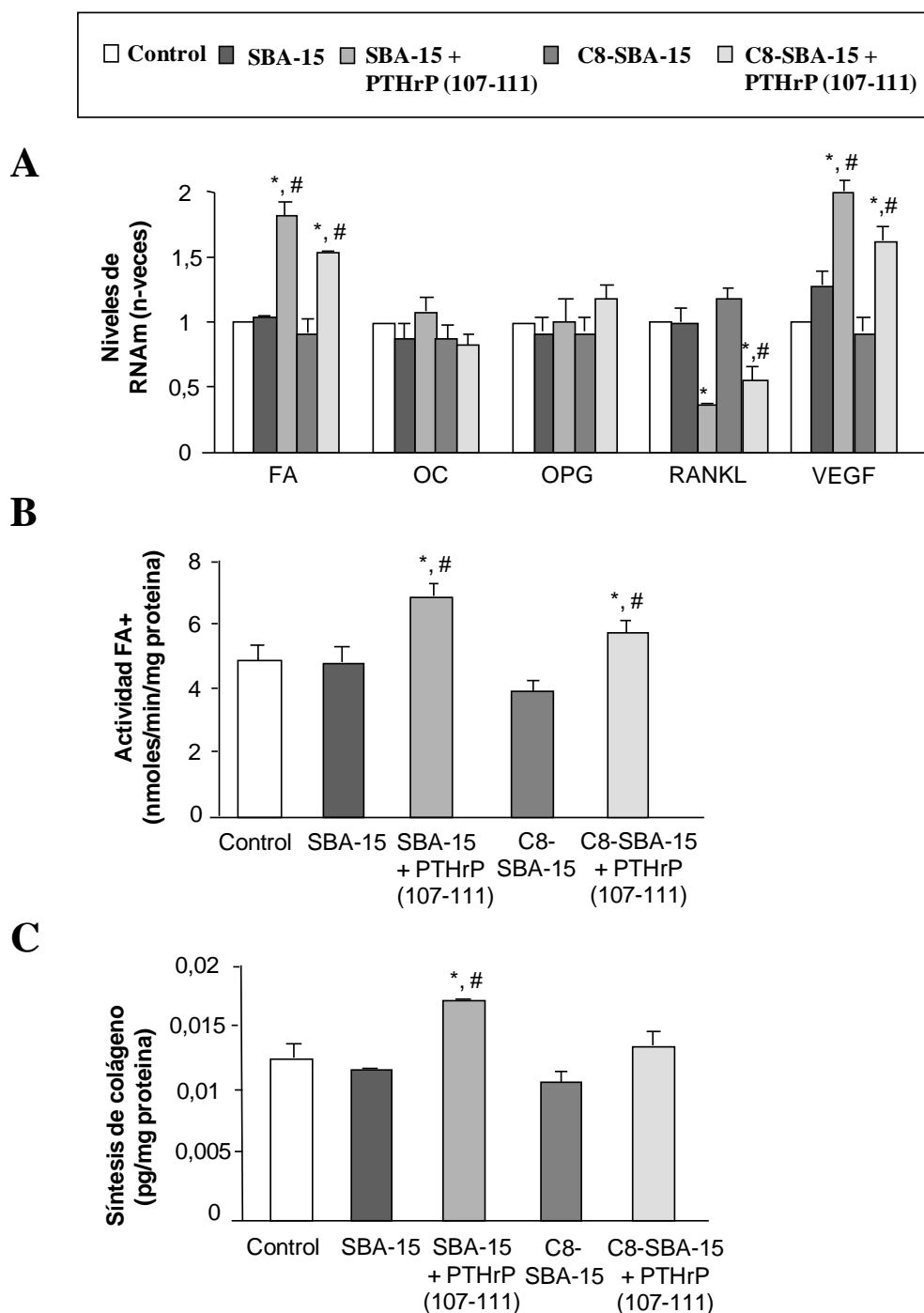


Figura 23. Cambios en la expresión génica (analizados por PCR a tiempo real) de factores osteoblásticos (A), en la actividad de FA (B) y en la síntesis de colágeno (C) inducidos por los biomateriales SBA-15 y C8-SBA-15, cargados o no con PTHrP (107-111) a los 2 días de cultivo en las células MC3T3-E1. Los resultados son medias \pm EEM de 4-5 experimentos independientes por triplicado. # $p < 0,05$ vs control; * $p < 0,05$ vs material sin cargar correspondiente.

Aemás, encontramos que la exposición de ambos tipos de biomateriales cargados con la PTHrP (107-111) aumentó de modo similar la mineralización en las MC3T3-E1 a los 12 días de cultivo (Fig. 24D). Ninguno de los materiales (no cargados con el péptido) estudiados afectó significativamente el crecimiento celular o alguno de los parámetros funcionales analizados en estas células, indicando que la PTHrP (107-111) es la responsable de los efectos osteogénicos observados (Fig. 22-24). De especial interés, se observó que un único pulso de dos días de PTHrP (107-111), a la misma concentración que la utilizada en los biomateriales estudiados (80 nM) al principio del cultivo celular, fue mucho menos eficaz que la exposición continua al biomaterial con el péptido cargado en cuanto a su capacidad para inducir la mineralización en estas células.

4.3. Efecto de la PTHrP (107-111) cargada en biocerámicas en un modelo de regeneración ósea tras un defecto cavitario en el fémur de conejo

Una vez comprobada la acción osteogénica de estos biomateriales con la PTHrP (107-111) *in vitro*, se propuso analizar *in vivo* sus posibles efectos sobre la regeneración ósea tras un defecto cavitario en el fémur del conejo, a las 4 y 8 semanas del implante. Del análisis histopatológico de las muestras óseas se obtuvieron los siguientes resultados:

a) SBA-15

A las 4 semanas de implantar el material SBA-15, éste se hallaba intacto rellenando el defecto cavitario producido en el fémur. La zona de entrada del biomaterial estaba ocupada por abundante tejido conectivo denso que restaura la solución de continuidad en la cavidad femoral. Alrededor del biomaterial se observó una gran presencia de osteoide (Fig. 25A) en zonas corticales, y una cápsula fibrosa que aísla y envuelve al material, sin interferir aparentemente con el área medular. No se observó reacción inflamatoria. A las 8 semanas, el biomaterial en contacto con la médula ósea no presentaba modificaciones significativas, permaneciendo aislado por la cápsula fibrosa. Por otra parte, en la zona en contacto con el hueso cortical se observó la formación de trabéculas en las proximidades del implante (Fig. 27A).

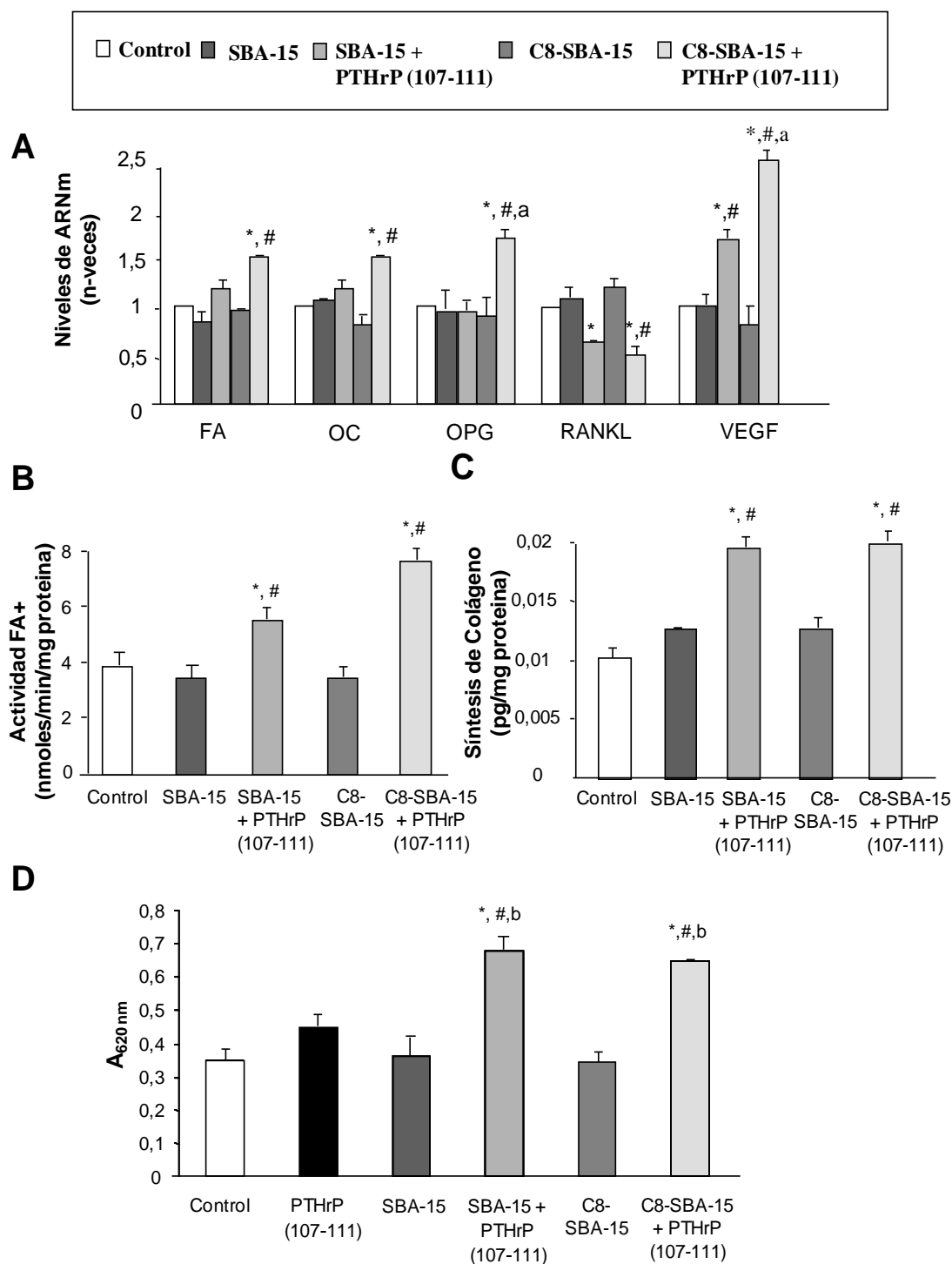


Figura 24. Cambios en la expresión génica (analizados por PCR a tiempo real) de factores osteoblásticos (A), en la actividad de FA (B), en la síntesis de colágeno (C) a los ocho días de cultivo, y en la mineralización (tinción con rojo de alizarina) a los 12 días (D), inducidos por los biomateriales SBA-15 y C8-SBA-15, cargados o no con PTHrP (107-111) en las células MC3T3-E1. La PTHrP (107-111) (100 nM) se añadió en una única dosis al comienzo del cultivo como control del péptido nativo solo frente al liberado por los biomateriales (D). Los resultados son medias \pm EEM de 3-5 experimentos independientes por triplicado. # $p < 0,05$ vs control; * $p < 0,05$ vs material sin cargar correspondiente; ap $< 0,05$ vs SBA-15 cargado con PTHrP (107-111); bp $< 0,05$ vs PTHrP (107-111).

b) C8-SBA-15

En los animales implantados con este material se observó un comportamiento similar al descrito para el implante de SBA-15 sin funcionalizar a las 4 semanas. Sin embargo, el C8-SBA-15 estaba aislado por una cápsula fibrosa de mayor espesor (Fig. 25C). La reparación ósea observada a las 8 semanas, abarcaba todo el defecto cavitario, observándose una cápsula fibrosa externa bien definida rodeada por osteoide que ocupaba la luz de la cavidad de entrada del biomaterial y trabéculas óseas de hueso neoformado rodeando la cara cortical del biomaterial (Fig. 27C).

c) SBA-15 + PTHrP (107-111)

En los conejos implantados con SBA-15 cargado con PTHrP (107-111), a las 4 semanas se observó una intensa cicatrización que abarcaba desde la cavidad de entrada del biomaterial (ahora ocupada por una gruesa capa de tejido conjuntivo fibroso con presencia de cartílago articular) y gran cantidad de osteoide rodeando al mismo. El biomaterial en contacto con el área medular se hallaba rodeado por una incipiente corona de hueso trabecular situada en la periferia de la superficie de osteoide (Fig. 25B). Por otra parte, el osteoide descrito a las 4 semanas, aumentó considerablemente alrededor de la cara cortical del biomaterial en dirección a la superficie externa a las 8 semanas; siendo, por el contrario, más limitada hacia la zona medular donde se pueden observar áreas trabeculares rodeando el biomaterial implantado (Fig. 27B).

d) C8-SBA-15 + PTHrP (107-111)

El comportamiento del C8-SBA-15 cargado con la PTHrP (107-111) fue similar al descrito en el grupo anterior, manteniéndose un mayor espesor de la cápsula fibrosa en comparación con los grupos que no estaban funcionalizados con C8 (Fig. 25D). A las 8 semanas, durante el proceso de reparación, se pudo observar una hiperplasia conjuntiva externa y del cartílago hialino y una hiperplasia ósea que conformaban el estrato tisular de las neoformaciones de osteoide que rodean al implante. Lo más destacado de este grupo fue la reacción interna observada en la cápsula fibrosa, la cual aparecía desdoblada permitiendo la aparición de un espacio ocupado por osteoide no calcificado que perfila la superficie intacta del biomaterial. (Fig. 27D).

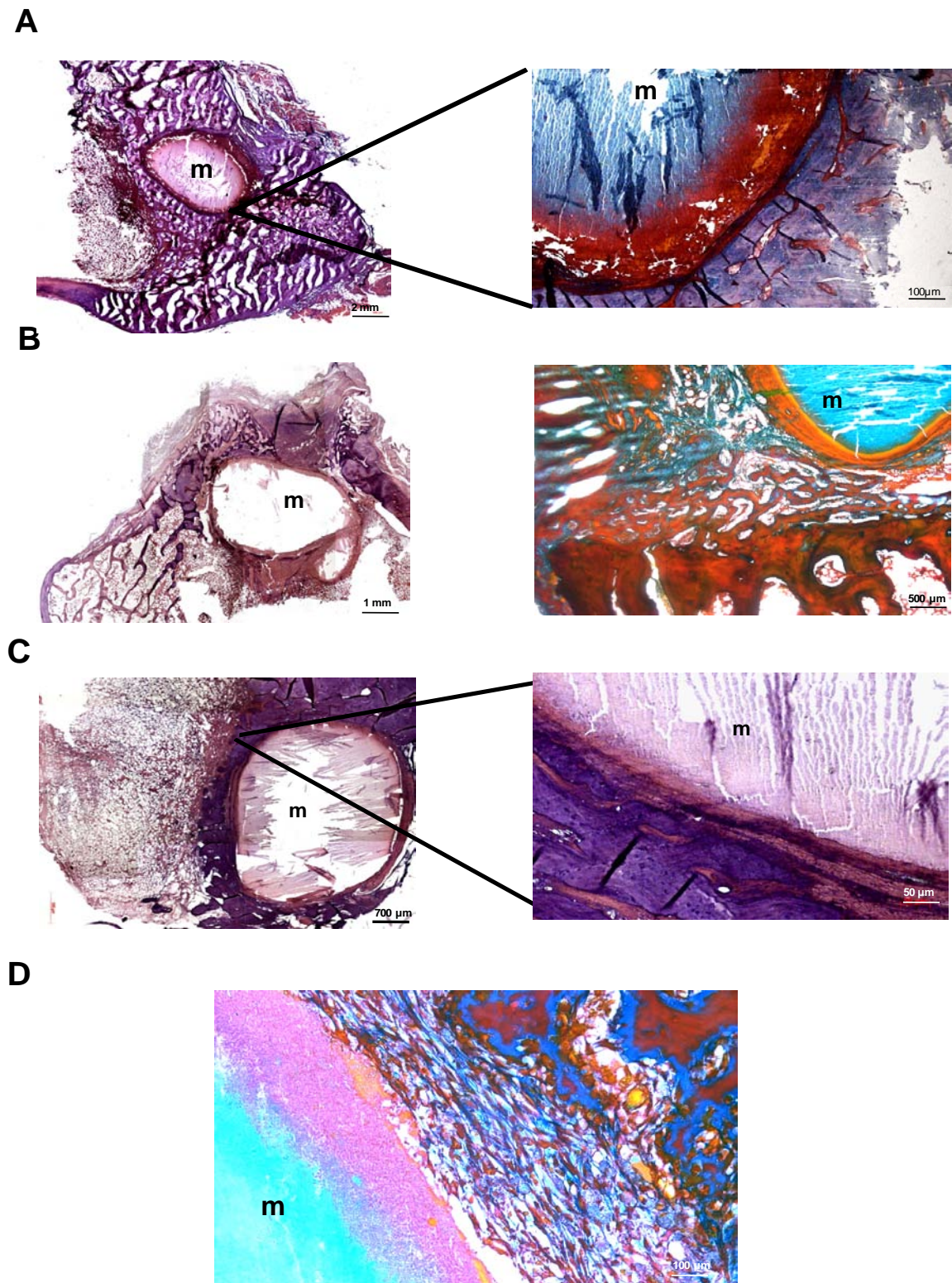


Figura 25. Imágenes representativas de la tinción de Masson en los fémures de conejos con los implantes de los biomateriales SBA-15 (A) o C8-SBA15 (C) sin cargar o cargados (B y D, respectivamente) con la PTHrP (107-111) a las 4 semanas del defecto cavitario. m= material correspondiente

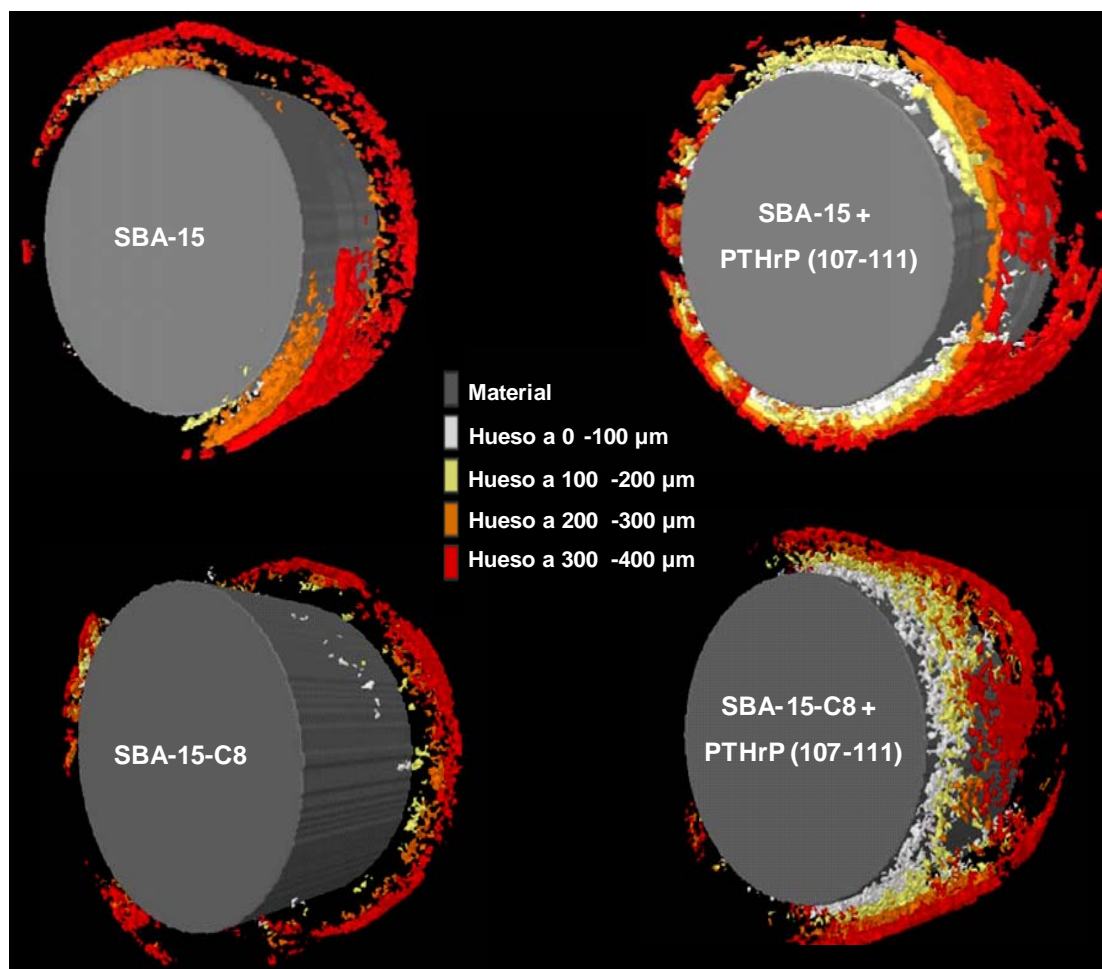


Figura 26. Imágenes representativas (analizadas por μ CT) de la neoformación ósea a diferentes distancias de cada uno de los biomateriales estudiados, con o sin PTHrP (107-111) a las 4 semanas de realizar el defecto cavitario en el fémur del conejo.

Las observaciones realizadas en el estudio histológico a 4 y 8 semanas para cada uno de los materiales, con o sin PTHrP (107-111), fueron confirmadas por estudios de μ CT. En las imágenes representativas de cada grupo experimental se puede observar la formación ósea *de novo* a diferentes distancias del material implantado (Figs. 26 y 28). El aumento de formación ósea observado en las imágenes correspondientes a los materiales cargados con PTHrP (107-111) se evidenció por el aumento del % de BV/TV y la disminución del Tb.Pf. en el fémur del conejo (Tabla 7).

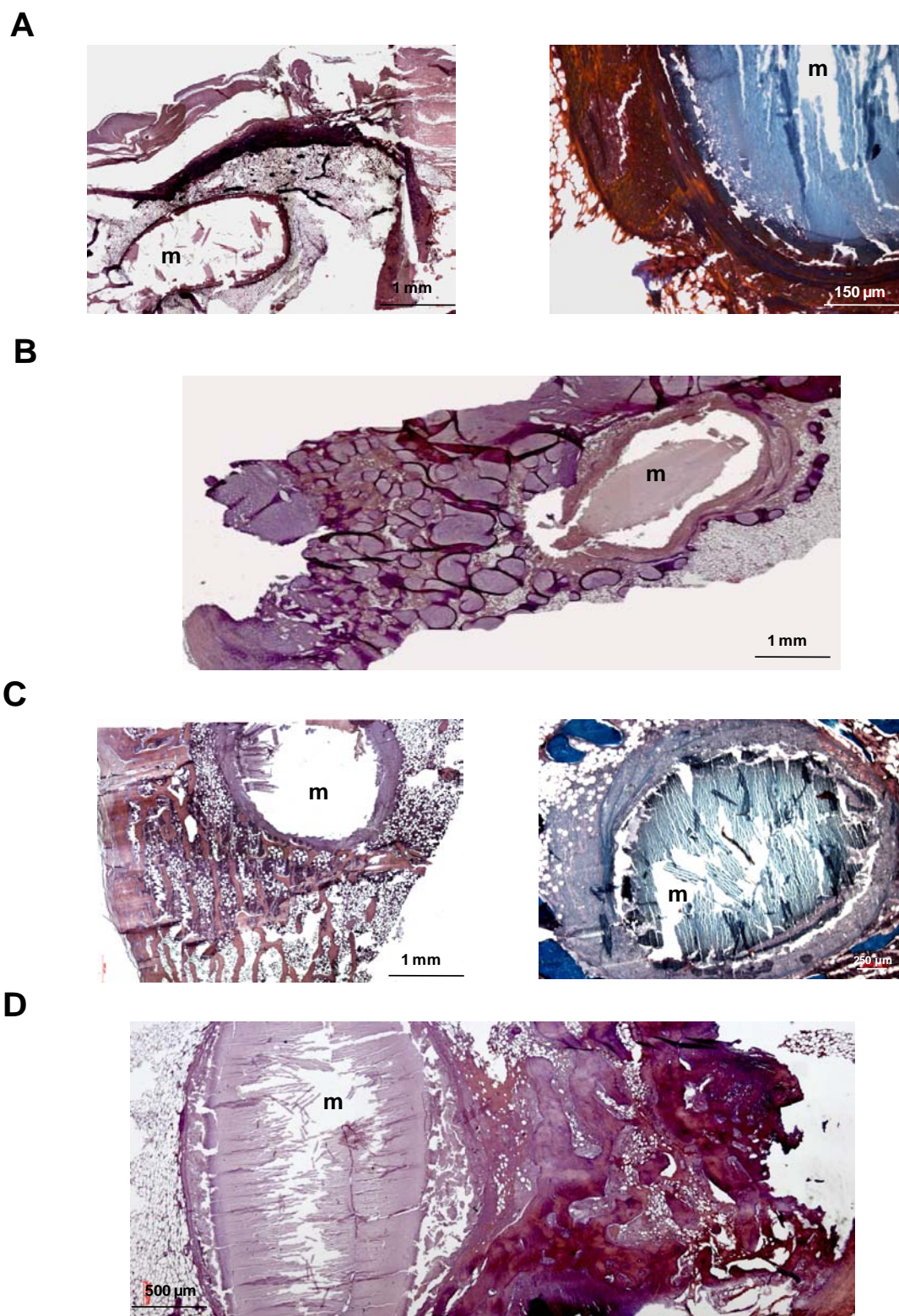


Figura 27. Imágenes representativas de la tinción de Masson en los fémures de conejos con implantes de los biomateriales SBA-15 (A) o C8-SBA15 (C) sin cargar o cargados (B y D, respectivamente) con la PTHrP (107-111) a las 8 semanas del defecto cavitario. m= material correspondiente.

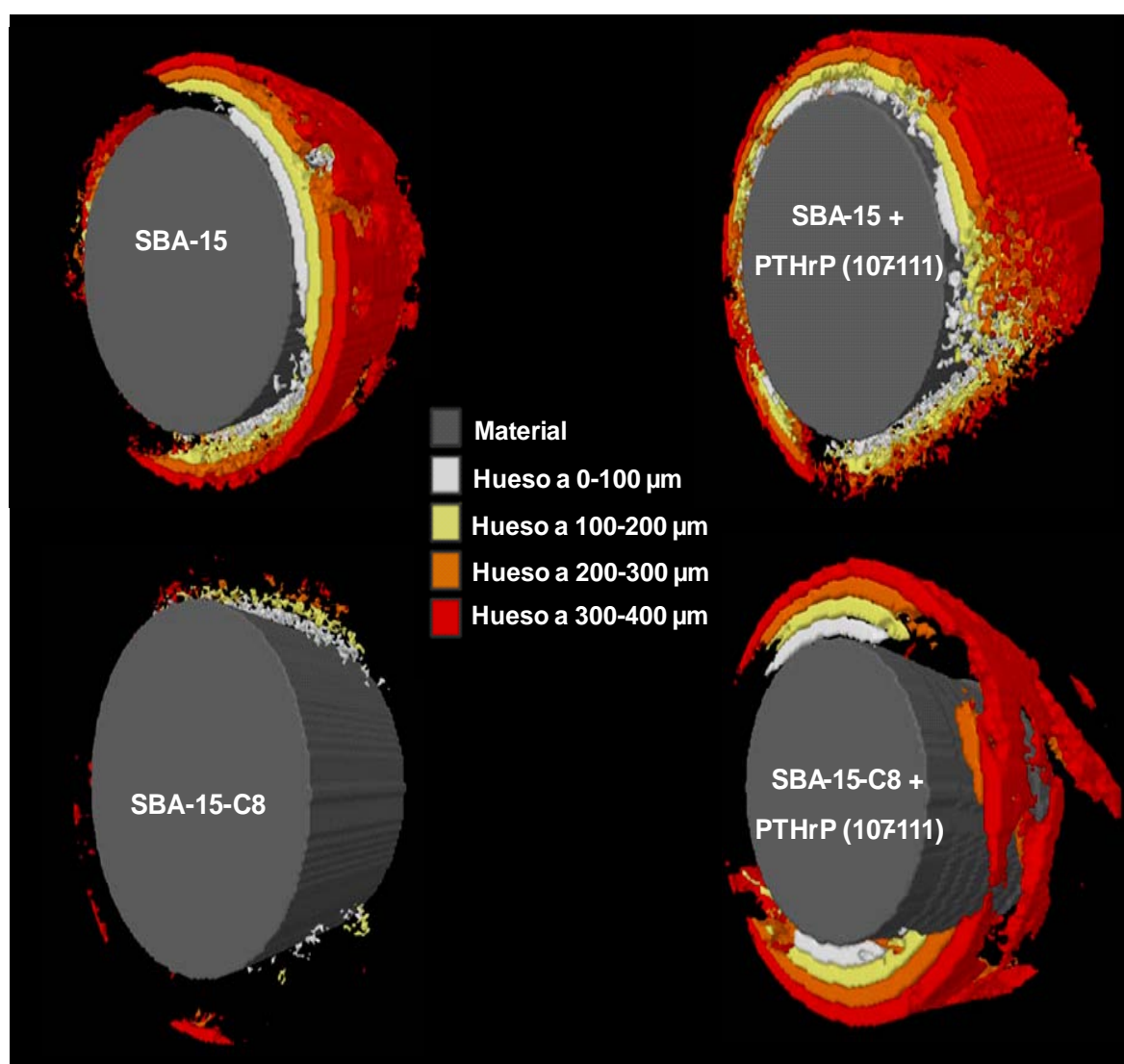


Figura 28. Imágenes representativas (analizadas por μ CT) de la neoformación ósea a diferentes distancias de cada uno de los biomateriales estudiados, con o sin PTHrP (107-111) a las 8 semanas de realizar el defecto cavitario en el fémur del conejo.

Los cambios observados en la histología y en la estructura ósea en el fémur del conejo se correlacionaron con un aumento de la tinción de OC en las muestras con materiales cargados con PTHrP (107-111) (Fig. 29A). Se observó una disminución en la inmunotinción de OC entre las 4 y 8 semanas tras el implante. Sin embargo, se observó un aumento de la tinción en los fémures que contenían los biomateriales cargados con PTHrP (107-111) en comparación con aquellos que no contenían el péptido. De especial interés es señalar que la presencia del péptido en el biomaterial C8-SBA-15 indujo un mayor efecto en este marcador que en el SBA-15. En ninguno de los fémures estudiados se observó un aumento del componente inflamatorio en

presencia de los diferentes materiales estudiados. Además, la presencia de células positivas para la inmunotinción de TRAP o de RAM11 (Fig. 29B y C) (marcaja de macrófagos) fue muy baja en todos los grupos de estudio (por debajo del 3%), siendo prácticamente nula en el caso de los materiales con PTHrP (107-111). Por otro lado, la inmunotinción de esclerostina en los osteocitos del hueso cortical fue mayor en las proximidades del C8-SBA-15 en comparación con el SBA-15, aunque en ambos casos la PTHrP (107-111) normalizó este efecto (Fig. 30A). No se pudieron cuantificar las diferencias en la inmunotinción positiva para VEGF (Fig. 30B), ya que el marcaje fue muy débil para este marcador en todos los grupos de estudio.

Tabla 7. Parámetros estructurales óseos a diferentes distancias de cada uno de los biomateriales implantados, con o sin PTHrP (107-111) a las dos y cuatro semanas del defecto cavitario producido en el fémur de conejo

4 semanas		SBA-15		SBA-15+ PTHrP(107-111)		C8-SBA-15		C8-SBA-15+ PTHrP(107-111)	
Distancia (μm)		BV/TV (%)	Tb.Pf (mm ⁻¹)	BV/TV (%)	Tb.Pf (mm ⁻¹)	BV/TV (%)	Tb.Pf (mm ⁻¹)	BV/TV (%)	Tb.Pf (mm ⁻¹)
109		0,50	60,82	27,74	28,01	2,01	35,62	26,75	0,59
218		0,97	40,23	10,43	8,53	2,32	35,30	20,50	4,95
327		3,82	28,27	14,48	14,35	4,03	28,37	17,60	8,01
436		10,43	16,43	25,71	5,02	8,68	18,95	18,15	9,53

8 semanas		SBA-15		SBA-15+ PTHrP(107-111)		C8-SBA-15		C8-SBA-15+ PTHrP(107-111)	
Distancia (μm)		BV/TV (%)	Tb.Pf (mm ⁻¹)	BV/TV (%)	Tb.Pf (mm ⁻¹)	BV/TV (%)	Tb.Pf (mm ⁻¹)	BV/TV (%)	Tb.Pf (mm ⁻¹)
109		13,65	17,42	24,24	19,92	1,95	35,24	2,86	8,75
218		19,91	16,88	33,23	9,38	1,17	38,23	6,40	10,03
327		25,75	14,68	44,08	6,25	1,13	44,96	23,29	4,11
436		33,60	9,59	46,45	7,12	1,14	34,05	34,84	2,90

BV/TV (%), porcentaje de volumen óseo; Tb.Pf., factor de patrón de hueso trabecular. Los datos corresponden a un conejo representativo de cada grupo.

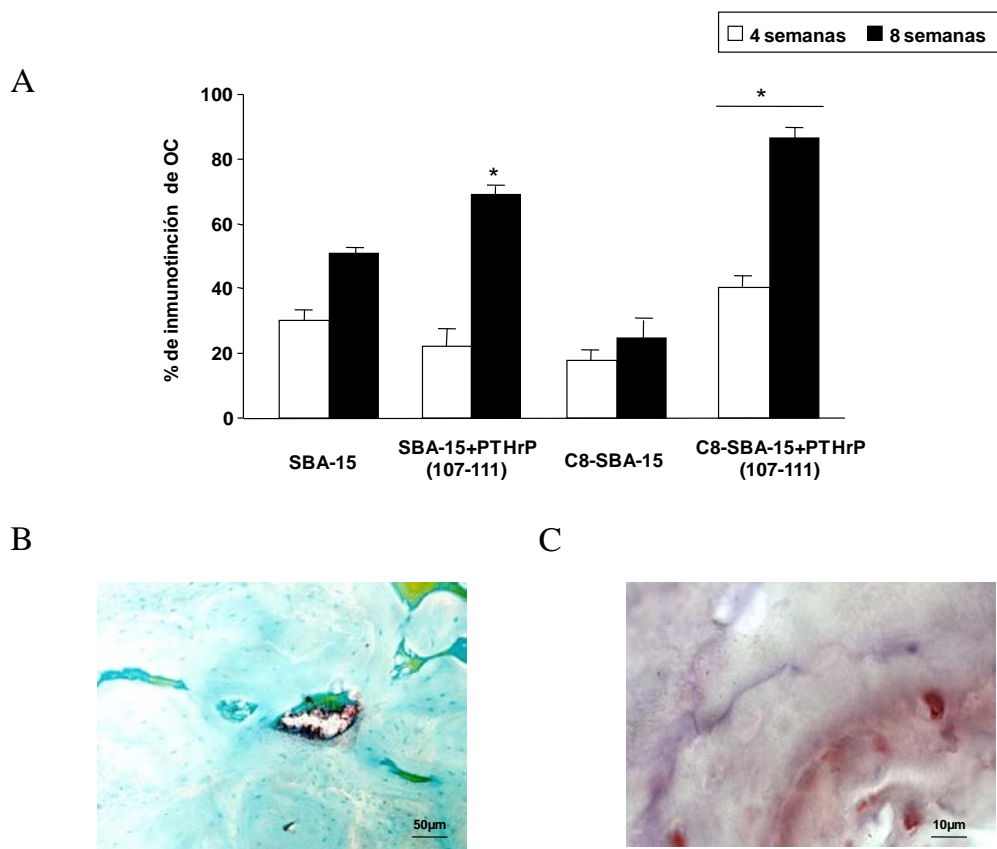


Figura 29. (A) Inmunotinción de osteocalcina en la zona preimplante de los biomateriales estudiados cargados o no con PTHrP (107-111) a las 4 y 8 semanas del defecto cavitario producido en el fémur del conejo. Los resultados son medias \pm EEM de 3 conejos por cada grupo experimental. * $p < 0,05$ vs material sin cargar correspondiente. Imágenes representativas de la inmunotinción de TRAP (B) y de RAM11 (C).

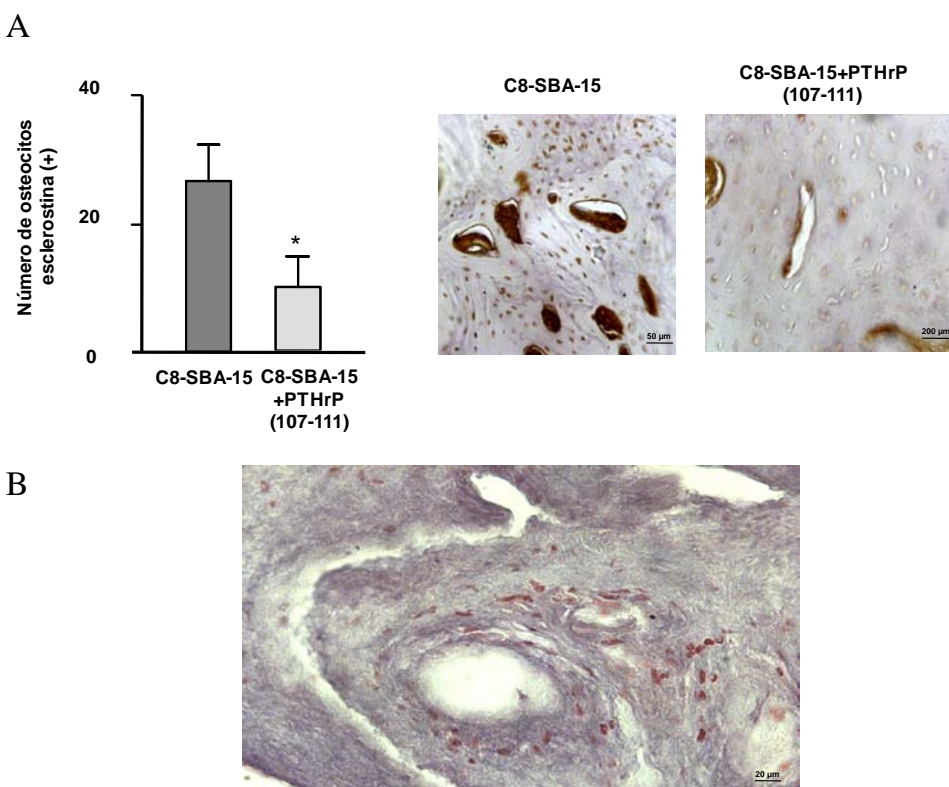


Figura 30. (A) Número de osteocitos positivos para esclerostina en el hueso cortical próximo al implante en el fémur de conejo en los grupos C8-SBA-15 y C8-SBA-15 + PTHrP (107-111) a las 8 semanas del defecto cavitario. Se muestran imágenes representativas de la inmunotinción de esclerostina en ambos grupos. Los resultados son medias \pm EEM de 3 conejos por cada uno de los grupos experimentales. * $p < 0,05$ vs C8-SBA-15. (B) Imagen representativa de la inmunotinción de VEGF.

5. Discusión

5. DISCUSIÓN

5.1. Efectos osteogénicos de la PTHrP (107-139) en ratones diabéticos con osteopenia y bajo remodelado óseo.

La pérdida de masa ósea asociada a la diabetes tipo 1 está bien demostrada. En esta situación, una gran variedad de alteraciones de la diabetes, incluyendo el déficit de insulina e IGF-1 y la hiperglucemia pueden contribuir a la osteopenia (33,134,240). Estudios previos en roedores diabéticos por inyección de STZ han demostrado una disminución de la formación ósea, tanto por histomorfometría como utilizando marcadores de remodelado óseo (137,138,191,241). En nuestro modelo, utilizando DXA, hemos observado una disminución de la masa ósea en el fémur intacto y en la tibia en regeneración a las 4 semanas de diabetes. Además, se observó por análisis de μ CT una disminución de hueso trabecular en el fémur intacto de estos ratones, mientras que los parámetros corticales no variaron significativamente; hechos que van en consonancia con estudios anteriores (137,138). La regeneración ósea tras la ablación medular en estos ratones diabéticos se ha demostrado que está disminuida o retardada en comparación con los controles (191). En esta Tesis, hemos ratificado y ampliado estos hallazgos, sugiriendo que la formación ósea disminuida en esta situación se debe, al menos en parte, a una disminución del sistema PTHrP en los osteoblastos.

Datos previos en roedores diabéticos no obesos o por inyección de STZ sugieren que la diabetes afecta principalmente a etapas tardías de la maduración osteoblástica (137,138). De hecho, en esta Tesis hemos observado una disminución de la expresión génica de OC en la tibia en regeneración de los ratones diabéticos. Sin embargo, los cambios observados en otros estudios en marcadores más tempranos de diferenciación osteoblástica son variables en función del modelo y los tiempos de observación utilizados (137,138,191). Así, al menos los niveles de expresión de Runx2 parecen disminuidos inicialmente para posteriormente normalizarse una vez establecida la diabetes (189). De acuerdo con estos hallazgos, encontramos que la expresión génica de Runx2 y OSX [un factor que es distal a Runx2 durante el desarrollo osteoblástico (242)] fue menor en los ratones diabéticos durante el proceso de reparación ósea, en concordancia con una menor neoformación ósea y una menor presencia de osteoblastos en la zona de regeneración ósea de la tibia. En cambio, se observó un aumento de expresión génica de los marcadores adipocíticos PPAR γ 2 y aP-2 en los ratones diabéticos, de acuerdo con resultados previos (113,137,138), y con el mayor número de adipocitos presentes en esta situación en dichos animales.

Estas alteraciones se asocian a una disminución del sistema de la PTHrP/PTHR1 así como del VEGF y sus receptores y del número de vasos sanguíneos [coherente con una deficiente diferenciación osteoblástica y angiogénica (84,240,243)] en la tibia en regeneración de los ratones diabéticos.

Los cambios inducidos por la diabetes en el hueso en regeneración incluían además una disminución del número de osteocitos totales y positivos para esclerostina en el hueso cortical, así como de la abundancia relativa de osteoclastos multinucleados. A priori, hubiéramos esperado un aumento de expresión de esclerostina en los ratones diabéticos, ya que se trata de un factor inhibidor de la formación ósea, si bien se justifica por la mayor tasa de apoptosis de osteocitos en los ratones diabéticos.

Datos similares a los observados en la expresión génica de factores osteoblásticos en la tibia en regeneración se obtuvieron en el fémur intacto de los ratones diabéticos; si bien el aumento de la expresión de RANKL puede parecer incoherente con una disminución de resorción ósea en éste y en otros modelos de diabetes tipo 1 (113,138,244,245). Sin embargo, esta aparente incongruencia podría explicarse por hallazgos recientes *in vitro* en los que la exposición crónica de pre-osteoclastos murinos a alta glucosa inhibió la osteoclastogénesis inducida por RANKL y la función osteoclástica a través de mecanismos redox (246).

El tratamiento con la PTHrP (107-139) revirtió los cambios deletéreos producidos en la estructura y en la masa óseas de los ratones diabéticos. Estos efectos se asociaron a su acción anabólica más que a sus propiedades antiresortivas descritas (85, 96-99). Así, en la tibia en regeneración de estos ratones, este fragmento no alteró la escasa presencia de osteoclastos multinucleados, positivos para TRAP; en consonancia con observaciones previas en este modelo de bajo remodelado óseo (113,138,244,245). Sin embargo, la administración de la PTHrP (107-139) revirtió los efectos negativos de la diabetes sobre el número de osteoblastos y osteocitos y en la angiogénesis, así como en la abundancia de adipocitos, durante la regeneración ósea tras la ablación medular. Además, la acción osteogénica de este fragmento C-terminal de la PTHrP se confirmó al evaluar la expresión génica de diversos marcadores osteogénicos y adipogénicos alterados por la diabetes en los huesos largos de los ratones.

Los resultados de esta Tesis demuestran un efecto angiogénico de la PTHrP (107-139) en situación diabética. Estudios previos han demostrado que este péptido y el fragmento N-terminal de la PTHrP estimulan la expresión de VEGF y su receptor VEGFR-2 en células osteoblásticas humanas *in vitro*, y también en la tibia en regeneración de ratones tratados con GCs (84,100,176,178). La sobreexpresión de

ambos receptores del VEGF, VEGFR1 y VEGFR2, por la PTHrP (107-139) en este trabajo de Tesis es de interés al considerar que ambos receptores parecen contribuir a la neoangiogénesis y la neoformación ósea durante la reparación ósea (188). Además, se ha sugerido que la PTHrP y el VEGF podrían modular de modo coordinado la angiogénesis y la formación ósea durante el crecimiento y la reparación ósea (226,239,247,248). Se ha demostrado una disminución de la señalización y/o la síntesis de la PTHrP así como de la producción de VEGF en células osteoblásticas humanas obtenidas de hueso trabecular en relación con la edad, sobre todo en aquellas menos diferenciadas (239,249). En conjunto, estos hallazgos sugieren que la disminución del sistema VEGF observada en los ratones diabéticos puede ser debida, al menos en parte, a la del sistema de la PTHrP. Sin embargo, una inhibición del factor inducible por hipoxia por la alta glucosa podría contribuir a la disminución de la expresión de VEGF en este modelo (250).

Además, se llevaron a cabo estudios en CMMO a partir de los huesos largos de ratones diabéticos, tratados o no con la PTHrP (107-139). De acuerdo con los resultados obtenidos *in vivo*, la diabetes indujo una disminución del tamaño y el número de colonias totales y FA+ así como de su capacidad de mineralización; estos efectos fueron revertidos por el tratamiento con la PTHrP (107-139).

Resultados similares a los observados en los ratones tratados con la PTHrP (107-139) se observaron en los ratones tratados con el fragmento N-terminal de la PTHrP, utilizado como control anabólico.

5.2. Efectos osteogénicos de la PTHrP (107-139) en células osteoblásticas de diferente grado de diferenciación en medio de alta glucosa

Con la finalidad de confirmar las acciones anabólicas del fragmento C-terminal de la PTHrP se estudiaron sus efectos *in vitro* en CMMO de ratones controles y en células osteoblásticas más diferenciadas de ratón MC3T3-E1 cultivadas con altas concentraciones de glucosa.

De forma similar a los resultados *in vivo* y *ex vivo* descritos en los ratones diabéticos, observamos que la alta glucosa (25 mM) disminuyó la expresión de Runx2, OC y PTHR1 y aumentó la de PPAR α y aP-2 en los cultivos de CMMO *in vitro*. Por otra parte, la alta glucosa indujo la adipogénesis en estas células crecidas en un medio adipogénico. La presencia de la PTHrP (107-139), continua o en pulsos, normalizó las alteraciones asociadas a la presencia de la glucosa elevada (formación de colonias totales y FA+, mineralización, adipogénesis y expresión génica de diferentes

marcadores) en las CMMO aisladas de ratones controles. La eficacia de este péptido de la PTHrP en pulsos es similar a lo observado previamente en otras líneas celulares osteoblásticas (84,100,251). De nuevo, estos efectos de la PTHrP C-terminal fueron similares a los observados en los cultivos de CMMO tratados con el fragmento N-terminal de la proteína.

Los hallazgos de esta Tesis demuestran que la alta glucosa, a través de un mecanismo osmótico, disminuye la maduración osteoblástica en células MC3T3-E1, que representan un fenotipo osteoblástico más diferenciado que las CMMO (252, 253). Los resultados obtenidos *in vitro* en las células MC3T3-E1 demuestran que el medio hiperosmótico por sí mismo suprime diferentes marcadores de diferenciación osteoblástica, tanto tempranos como tardíos, así como los sistemas PTHrP y VEGF. Estudios previos utilizando esta misma línea celular examinaron el efecto de la exposición aguda o crónica (hasta un mes) a la alta glucosa o manitol sobre la diferenciación osteoblástica. Los resultados de estos estudios sugieren que dicha exposición crónica más que la aguda favorece respuestas independientes del estrés osmótico en estas células (243). Los resultados de esta Tesis en las células MC3T3-E1, utilizando un tiempo relativamente corto (5 días) de exposición a la glucosa elevada, están de acuerdo con esta hipótesis. El hecho de que, en estas condiciones, el estrés osmótico parezca ser el principal mediador de los cambios inducidos por la alta glucosa en la expresión génica de diferentes marcadores osteoblásticos no es sorprendente, al considerar que los osteoblastos no expresan Glut 2, el único transportador de glucosa con una Km suprafisiológica para la glucosa (254,255). Sin embargo, la elevada glucosa *per se* podría aumentar la expresión de Glut 1 (proteína que facilita el transporte de la glucosa a través de la membrana plasmática celular) en estas células (256), contribuyendo así a la disminución de la función osteoblástica en situación diabética, como se ha sugerido recientemente (243).

Por otro lado, no se observó un efecto significativo de la alta glucosa (o el manitol) en la actividad de FA, la mineralización o la síntesis de colágeno en los cultivos celulares de MC3T3-E1, aunque sí una tendencia al aumento en estos dos últimos parámetros, de acuerdo con estudios previos (234, 257). Estos datos son discrepantes con la disminución de la DMO y la CMO en los ratones diabéticos aquí estudiados. Sin embargo, la situación *in vivo* implica la existencia de factores adicionales como el déficit de insulina o de IGF-1 y los productos finales de la glicosilación avanzada (AGES) que pueden contribuir a inhibir la mineralización de la matriz ósea en la diabetes (258). Además, los resultados expuestos demuestran una disminución moderada, aunque significativa, de células viables cuando crecen en un medio con alta glucosa. Esto está de acuerdo con la disminución de colonias

observada en las CMMO obtenidas de los ratones diabéticos o de ratones control cultivadas en este medio. En este sentido, un estudio realizado en células MG-63 de osteosarcoma humano ha demostrado que una concentración de glucosa elevada (50 mM) afecta a la síntesis de poliaminas y disminuye así el crecimiento celular (259).

En el presente estudio, encontramos que en las células MC3T3-E1 crecidas en un medio con glucosa normal, la PTHrP (107-139) aumentó la actividad de FA, la síntesis de colágeno y la mineralización, así como la expresión génica de diferentes factores osteoblásticos. Algunos de estos efectos no fueron reproducidos por el péptido truncado PTHrP (109-138), pero sí por la osteostatina. Además, un anticuerpo contra la osteostatina fue capaz de neutralizar la acción de la PTHrP (107-139) en estas células. Estos datos apoyan la hipótesis de que este pentapéptido es responsable de la interacción de la PTHrP (107-139) con los osteoblastos (87,251,260). De hecho, el análisis de la PTHrP (107-139) por espectroscopía de resonancia magnética nuclear indica que la región de la osteostatina, en contraste con el resto de la secuencia, forma una estructura en forma de dedo extendido para interactuar con su posible receptor, diferente del PTHR1 (261). También es de interés en este contexto, que la osteostatina podría generarse a partir de la PTHrP (107-139) *in vivo*, ya que este péptido es sustrato de la proteasa PHEX (gen regulador de fosfatos con homología para endopeptidasas en el cromosoma X), abundante en los osteoblastos (95).

Los resultados de esta Tesis sugieren la existencia de una interacción en las vías de señalización por las que las regiones N- y C-terminal de la molécula de PTHrP intacta (o ambos fragmentos N-y C-terminal de esta proteína) restablecen la función osteoblástica alterada en la diabetes *mellitus*. Así, encontramos que la neutralización de la PTHrP endógena con anticuerpos específicos contra ambas regiones N-terminal y C-terminal de la PTHrP o bien antagonistas del receptor PTHR1 reprodujeron los efectos deletéreos de la alta glucosa en la diferenciación de las células MC3T3-E1. Además, la PTHrP (107-139) aumentó la expresión génica del PTHR1 en los ratones diabéticos *in vivo* y en las células MC3T3-E1 crecidas en alta glucosa. A este respecto, se ha demostrado que este péptido es capaz de interactuar con la señalización de PTHR1 en células osteoblásticas (87); y que ambos fragmentos N- y C-terminal de la PTHrP combinados son igual de eficientes que cada uno de ellos por separado para afectar a la función osteoblástica (178,262). La activación de MAPKs podría ser un mecanismo clave en este sentido (81,84,253).

Como conclusión de los Apartados 5.1 y 5.2, los hallazgos presentados en esta Tesis en un modelo de ratones diabéticos con osteopenia de bajo remodelado y en

diferentes modelos celulares *in vitro* que reproducen el estado diabético, demuestran que:

1. La PTHrP ejerce un papel relevante en la disminución de la función osteoblástica en esta situación experimental.
2. La PTHrP (107-139) ejerce efectos anabólicos para promover la formación y la regeneración ósea, independientes de su acción inhibidora de los osteoclastos.

5.3. Efectos osteogénicos de la PTHrP (107-111) cargada en biocerámicas *in vitro* y en un modelo de regeneración ósea tras un defecto cavitario en el fémur del conejo *in vivo*

Los resultados discutidos en los Apartados anteriores demuestran la acción osteogénica de la PTHrP (107-139), a través de la osteostatina, en un modelo de regeneración ósea. Estos hallazgos abren nuevas perspectivas en el contexto de la reparación ósea, ya que sugieren que la exposición local a este pentapéptido en el entorno óseo promovería dicha reparación. Así pues, en una primera aproximación, nos propusimos confirmar esta hipótesis utilizando materiales mesoporosos cargados con la PTHrP (107-111).

En primer lugar, se evaluó la capacidad de los materiales SBA-15 y C8-SBA-15 con la PTHrP (107-111) para liberar al medio el péptido y se observó que el primero liberaba aproximadamente un 4% más que el material funcionalizado con C8 a lo largo del tiempo. Esta diferencia en el perfil de liberación con ambos biomateriales es similar al obtenido con los mismos materiales cerámicos cargados con L-triptófano, el aminoácido C-terminal de la PTHrP (107-111) (205). Hay que tener en cuenta que las cargas negativas del SBA-15 al pH fisiológico utilizado en el proceso de captura del péptido promueven las interacciones electroestáticas con las cargas ligeramente positivas de los grupos amino en la PTHrP (107-111) a este pH (264). Sin embargo, la superficie hidrofóbica del C8-SBA-15 es capaz de interaccionar con el anillo indol del triptófano en este péptido; aunque esta funcionalización deja un espacio disponible menor (ocupado por cadenas alquílicas) para la adsorción del péptido en el interior de los poros en comparación con el SBA-15 (205). Esto justifica que este material retenga algo más de PTHrP (107-111) que el C8-SBA-15.

Los resultados expuestos demuestran que el material SBA-15 cargado con la PTHrP (107-111) aumenta la viabilidad celular, estimula la expresión génica y la

actividad de la FA, la síntesis de colágeno y los niveles de ARNm del VEGF. Aunque la expresión génica de OPG no se modificó por el biomaterial, la de RANKL disminuyó, aumentando así la relación OPG/RANKL en estas condiciones. De este modo, el SBA-15 cargado con la PTHrP (107-111) podría inhibir la osteoclastogénesis *in vivo*, de acuerdo a las propiedades antiresortivas de este péptido (97,264). El material C8-SBA-15 cargado con la PTHrP (107-111) indujo efectos similares a los observados con el material sin funcionalizar a los 8 días de cultivo, aumentando además la expresión génica de OPG y OC. Estas diferencias entre ambos materiales no parecen deberse a distintas cantidades de péptido liberado a los 8 días de cultivo, que fueron similares en un rango de 0,5-1 nM. Por el contrario, parecen más bien relacionadas con un posible aumento de la concentración local en el microambiente óseo de la PTHrP (107-111) en la superficie externa del C8-SBA-15. Así pues, estos datos sugieren la mayor eficacia de este biomaterial comparado con el SBA-15 cargado con la PTHrP (107-111) para modular la función osteoblástica.

Ambos materiales sin péptido cargado fueron ineficaces sobre los parámetros estudiados en estas células, indicando que la PTHrP (107-111) es responsable de los efectos osteogénicos observados. Conviene resaltar que un único pulso de dos días de osteostatina, a la máxima concentración liberada por los biomateriales estudiados (80 nM) fue menos eficaz que la exposición continua y prolongada a los biomateriales para inducir la mineralización en las células MC3T3-E1. En este sentido, estudios previos en cultivos primarios de células osteoblásticas de calotas de rata han demostrado que la PTHrP (107-111) a concentraciones incluso <nM induce el crecimiento celular (251). Los datos aquí presentados ponen de manifiesto que el péptido liberado por los biomateriales en este rango de dosis induce efectos osteogénicos en las células MC3T3-E1. Estos hallazgos apoyan la idoneidad de los biomateriales cargados con PTHrP (107-111) para su liberación local e inducir osteogénesis, un aspecto especialmente relevante desde la perspectiva de su potencial uso clínico.

Considerando estos hallazgos *in vitro*, nos propusimos determinar la capacidad osteogénica de la PTHrP (107-111) cargada en estos materiales mesoporosos *in vivo*. Con tal finalidad, se desarrolló un modelo de regeneración ósea tras provocar un defecto cavitario en el fémur de conejo. A las 4 semanas del defecto, tanto el SBA-15 como el C8-SBA-15 promovieron la osteointegración, con presencia de tejido conectivo y osteoide, de acuerdo con estudios anteriores con otros materiales cerámicos (265). Este efecto fue más acusado en el caso de ambos biomateriales con osteostatina adsorbida, como indica la presencia de trabéculas neoformadas en las inmediaciones del biomaterial y la menor cápsula fibrosa, sobre todo a las 8 semanas.

La ausencia de respuesta inflamatoria con estos biomateriales, como indica la ausencia significativa de células con tinción de RAM11 (macrófagos) y TRAP, como consecuencia de su estabilidad (sin degradación aparente) constituye una ventaja de este tipo de biomateriales (265). Un cierto grado de actividad de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 y 6) se detecta en fases precoces de desarrollo del callo de fractura en algunos modelos animales (183). Sin embargo, una inflamación sostenida asociada a la degradación de materiales como el β -TCP (fosfato tricálcico ultraporoso) o el DCaS (sulfato de calcio denso) puede comprometer la regeneración ósea en defectos óseos -como consecuencia del desacoplamiento entre la regeneración ósea y la resorción- (265).

Se han mencionado las características de la PTH y del fragmento N-terminal de la PTHrP como agentes anabólicos cuando se administran de forma sistémica en humanos y en modelos animales de osteoporosis y/o fractura ósea. En concreto, estudios en los que se utiliza la PTHrP (1-36) o un análogo sintético de la PTHrP (RS-66271) han demostrado un aumento de la DMO de la columna vertebral en mujeres postmenopáusicas, así como del hueso cortical y trabecular en ratas osteopénicas (41). Además, el RS-66271 de modo sistémico ha demostrado ser eficaz para aumentar la reparación ósea en conejos tratados con glucocorticoides (osteopénicos), aumentando la DMO y los parámetros biomecánicos y normalizando los cambios histológicos inducidos por la pérdida de hueso (266). Por otro lado, diferentes factores locales óseos (IL-1/6, IGF-1, TGF- β , BMPs) han sido propuestos como posibles agentes para promover la reparación ósea (183, 267), aunque existen pocos estudios del efecto de dichos factores incorporados a un material en este contexto. Algunas BMPs son necesarias para el desarrollo óseo e inducen formación ósea endocondral cuando son inyectadas subcutáneamente en ratones (179). En un modelo de fractura en ratón, la expresión génica de BMP2 y BMP4 aumentó a tiempos cortos, mientras que BMP5, BMP6 y BMP7 se expresaron a tiempos largos (268). Este hecho concuerda con los resultados observados en humanos donde se observa que BMP3 y BMP7 se expresan en osteoblastos que sintetizan hueso neoformado, mientras que la BMP2 y la BMP4 se expresan de forma mayoritaria en los condrocitos maduros e hipertróficos (269).

La liberación local de factores de crecimiento en defectos óseos, como representa el modelo usado en esta Tesis, se ha demostrado como eficaz y ventajosa frente a su administración exógena. Así, un estudio en ratas sometidas a un defecto segmentario en el fémur e implantadas con matrices degradables que contenían ADN plasmídico de BMP4 y/o del fragmento 1-34 de la PTH aumentaron (en mayor medida cuando la matriz poseía ambos factores) la formación de hueso nuevo en el defecto

provocado (270). Algunos autores han estudiado la interacción entre la PTHrP y el IGF-1 endógenos como reguladores de la reparación ósea tras la fractura en ratas (271). En este modelo, al inicio de la formación del callo cartilaginoso, el IGF-1 parece aumentar la condrogénesis, mientras que la PTHrP regularía la tasa de diferenciación de condrocitos y, tras la osificación endocondral, ambos factores parecen actuar coordinadamente para aumentar la osteogénesis a través de acciones autocrinas y paracrinas. La PTHrP, cuya expresión aumenta en las células preosteoblásticas, a través de su fragmento N-terminal podría estimular la diferenciación y la síntesis de colágeno en estas células a través del IGF-1 (271). Los resultados de esta Tesis obtenidos en el modelo de defecto cavitario apoyan la hipótesis de que el fragmento C-terminal de la PTHrP ejerce efectos anabólicos locales para promover la reparación ósea, posiblemente independientes del IGF-1, basándonos en datos previos *in vitro* (84). Los datos expuestos resaltan la importancia de la osteostatina como factor anabólico liberado de forma local en las inmediaciones de los materiales implantados; como demuestra la histología y el análisis de μ CT.

A la vista de los resultados expuestos *in vitro e in vivo*, la PTHrP (107-111) cargada en el material C8-SBA-15 ejerce un mayor efecto osteogénico en comparación con el material sin funcionalizar. Es posible que el mayor efecto osteogénico con este biomaterial se deba al péptido remanente adsorbido a la cerámica, cuyas concentraciones aparentes demostraron ser suficientes para estimular la proliferación de células osteoblásticas *in vitro*, en comparación con el SBA-15 en el que el péptido es liberado de forma más rápida.

Como conclusión de este Apartado 5.3, teniendo en cuenta que en el tratamiento de defectos óseos, hay situaciones que precisan técnicas de ingeniería tisular para favorecer la regeneración ósea, los hallazgos presentados en esta Tesis son relevantes en este escenario al demostrar:

1. La capacidad de biomateriales cerámicos como soportes de liberación local de la PTHrP (107-111) para favorecer la regeneración ósea tras un defecto cavitario en el fémur del conejo.
2. Las acciones osteogénicas de estos biomateriales a través de sus acciones directas sobre los osteoblastos.

6. Conclusiones

6. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, podemos llegar a las siguientes conclusiones:

- 1.- La PTHrP juega un papel relevante en la disminución de la función osteoblástica asociada a la DM tipo 1.
- 2.- La PTHrP (107-139) ejerce efectos anabólicos sobre la formación y la regeneración ósea, independientes de su acción inhibidora de los osteoclastos, en el modelo de ratones diabéticos con bajo remodelado óseo.
- 3.- La PTHrP (107-139) y el dominio de la osteostatina inducen efectos anabólicos sobre la osteogénesis en células osteoblásticas de distinto grado de diferenciación *in vitro*.
- 4.- Estos efectos osteogénicos de la PTHrP C-terminal son similares a los inducidos por el fragmento N-terminal homólogo con la PTH.
- 5.- Los materiales cerámicos SBA-15 y C8-SBA-15 son idóneos como soporte de liberación de la PTHrP (107-111) para favorecer la regeneración ósea en un modelo de defecto cavitario en conejos.

Los hallazgos de esta Tesis Doctoral, planteada como aproximación experimental preclínica, apoyan la posible utilización del fragmento C-terminal de la PTHrP con la secuencia osteostatina como alternativa terapéutica en la reparación y la regeneración óseas.

7. Bibliografía

7. Bibliografía

1. Podenphant J, Engel U. Regional variations in histomorphometric bone dynamics from the skeleton of an osteoporotic woman. *Calcif Tissue Int* 40: 184-188, 1987.
2. Gonzalez Macías J, Olmos Martinez L. Introducción: Fisiopatología del remodelado óseo, in Formadores de Hueso, X. Nogués, Editor. Scientific communication management: Barcelona. 13-25, 2005.
3. Weiner S, Traub W, Wagner HD. Lamellar bone: structure- unction relations. *J Struct Biol* 126: 241-255, 1999.
4. Brandi ML. Bone endothelial cells: a tool for analyzing cell to cell interactions in the skeletal tissue. *EXS* 61: 250-254, 1992.
5. Gerber HP, Ferrana N. Angiogenesis and bone growth. *Trends Cardiovascular Med* 10: 223-228, 2000.
6. Streeten EA, Brandi ML. Biology of bone endothelial cells. *Bone Miner* 10: 85-94, 1999.
7. Reed MJ, Corsa A, Pendergrass W, Penn P, Sage EH, Abrass IB. Neovascularization in aged mice: delayed angiogenesis is coincident with decreased levels of transforming growth factor beta1 and type I collagen. *Am J Pathol* 152: 113-123, 1998.
8. Rivard A, Fabre JE, Silver M, Chen D, Murohara T, Kearney M, et al. Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation* 99: 111-120, 1999.

9. Raisz LG. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem* 45: 1353-1358, 1999.
10. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten P. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn* 235: 176-190, 2006.
11. Serrano S, Aubia J, Mariñoso M. Patología ósea metabólica. Sandoz S.A.E: Barcelona. 1990.
12. Finkelstein JS, Klibanski A, Schaefer EH, Hornstein Md, Schiff I, Neer RM. Parathyroid hormone for the prevention of bone loss induced by estrogen deficiency. *N Engl J Med* 331: 1618-1623, 1994.
13. O'Brien CA, Plotkin LI, Galli C, Goellner JJ, Gortazar AR, Allen MR, Robling AG, Bouxsein M, Schipani E, Turner CH, Jilka RL, Weinstein RS, Manolagas SC, Bellido T. Control of bone mass and remodeling by PTH receptor signaling in osteocytes. *PLoS One* 3: e2942, 2008.
14. Samura A, Wada S, Suda S, Iitaka M, Katayama S. Calcitonin receptor regulation and responsiveness to calcitonin in human osteoclast-like cells prepared in vitro using receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and macrophage colony-stimulating factor. *Endocrinology* 141: 3774-3782, 2000.
15. Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest* 104: 1363-1374, 1999.
16. Beresford JN, Gallagher JA, Russell RG. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and human bone-derived cells in vitro: effects on alkaline phosphatase, type I collagen and proliferation. *Endocrinology* 119: 1776-1785, 1986.

17. Canalis E. The hormonal and local regulation of bone formation. *Endocr Rev* 4: 62-77, 1983.
18. Owen TA, Aronow MS, Barone LM, Bettencourt B, Stein GS, Lian JB. Pleiotropic effects of vitamin D on osteoblast gene expression are related to the proliferative and differentiated state of the bone cell phenotype: dependency upon basal levels of gene expression, duration of exposure, and bone matrix competency in normal rat osteoblast cultures. *Endocrinology* 128: 1496-1504, 1991.
19. Bellid T, Jilka RL, Boyce BF, Girasole G, Broxmeyer H, Dalrymple SA, Murray R, Manolagas SC. Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis, and bone mass by androgens. The role of the androgen receptor. *J Clin Invest* 95: 2886-2895, 1995.
20. Colvard D, Spelsberg T, Eriksen E, Keeting P, Riggs BL. Evidence of steroid receptors in human osteoblast-like cells. *Connect Tissue Res* 20: 33-40, 1989.
21. Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS, Boyce B, Broxmeyer H, Manolagas SC. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science* 257: 88-91, 1992.
22. Manolagas SC, Kousteni S, Jilka RL. Sex steroids and bone. *Recent Prog Horm Res* 57: 385-409, 2002.
23. Gohel, A, McCarthy MB, Gronowicz G. Estrogen prevents glucocorticoid-induced apoptosis in osteoblasts in vivo and in vitro. *Endocrinology* 140: 5339-5347, 1999.
24. Saag KG, Koehnke R, Caldwell JR, Brasington R, Burmeister LF, Zimmerman B, Kohler JA, Furst DE. Low dose long-term corticosteroid therapy in

- rheumatoid arthritis: an analysis of serious adverse events. *Am J Med* 96: 115-123, 1994.
25. Clowes JA, Peel N, Eastell R. Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol* 13: 326-332, 2001.
26. Jia D, O'Brien CA, Stewart SA, Manolagas SC, Weinstein RS. Glucocorticoids act directly on osteoclasts to increase their life span and reduce bone density. *Endocrinology* 147: 5592-5599, 2006.
27. Weinstein RS, Chen JR, Powers CC, Stewart SA, Landes RD, Bellido T, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Promotion of osteoclast survival and antagonism of bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis by glucocorticoids. *J Clin Invest* 109: 1041-1048, 2002.
28. Rubin MR, Bilezikian JP. Clinical review 151: The role of parathyroid hormone in the pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis: a re-examination of the evidence. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 4033-4041, 2002.
29. Lukert BP, Raisz LG. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathogenesis and management. *Ann Intern Med* 112: 352-364, 1990.
30. Canalis E, Giustina A. Glucocorticoid-induced osteoporosis: summary of a workshop. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 5681-5685, 2001.
31. Pun KK, Lau P, Ho PW. The characterization, regulation, and function of insulin receptors on osteoblast-like clonal osteosarcoma cell line. *J Bone Miner Res* 4: 853-862.
32. Akune T, Ogata N, Hoshi K, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Takagi H, Azuma Y, Kadowaki T, Nakamura K, Kawaguchi H. Insulin receptor substrate-2

- maintains predominance of anabolic function over catabolic function of osteoblasts. *J Cell Biol* 159: 147-156, 2002.
33. Inzerillo AM, Epstein S. Osteoporosis and diabetes mellitus. *Rev Endocr Metab Disord* 5: 261-268, 2004.
 34. Bassett JH, Williams GR. The molecular actions of thyroid hormone in bone. *Trends Endocrinol Metab* 14: 356-364, 2003.
 35. Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys* 473: 201-209, 2008.
 36. Reseland JE, Syversen U, Bakke I, Qvigstad G, Eide LG, Hjertner O, Gordeladze JO, Drevon CA. Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization. *J Bone Miner Res* 16: 1426-1433, 2001.
 37. Bonewald LF. Mechanosensation and Transduction in Osteocytes. *Bonekey Osteovision* 3: 7-15, 2006.
 38. Papachroni KK, Karatzas DN, Papavassiliou KA, Basdra EK, Papavassiliou AG. Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease. *Trends Mol Med* 15: 208-216, 2009.
 39. Bakker AD, Soejima K, Klein-Nulend J, Burger EH. The production of nitric oxide and prostaglandin E(2) by primary bone cells is shear stress dependent. *J Biomech* 34: 671-677, 2001.
 40. Verborgt O, Tatton NA, Majeska RJ, Schaffler MB. Spatial distribution of Bax and Bcl-2 in osteocytes after bone fatigue: complementary roles in bone remodeling regulation? *J Bone Miner Res* 17: 907-914, 2002.

41. Kamioka H, Honjo T, Takano-Yamamoto T. A three-dimensional distribution of osteocyte processes revealed by the combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy. *Bone* 28: 145-149, 2001.
42. Miyakoshi N, Kasukawa Y, Linkhart TA, Baylink DJ, Mohan S. Evidence that anabolic effects of PTH on bone require IGF-I in growing mice. *Endocrinology* 142: 4349-4356, 2001.
43. Ohlsson C, Bengtsson BA, Isaksson OG, Andreassen TT, Słotweg MC. Growth hormone and bone. *Endocr Rev* 19: 55-79, 1998.
44. Celil AB, Campbell PG. BMP-2 and insulin-like growth factor-I mediate Osterix (Osx) expression in human mesenchymal stem cells via the MAPK and protein kinase D signaling pathways. *J Biol Chem* 280: 31353-31359, 2005.
45. Ahdjoudj S, Lasmoles F, Holy X, Zerath E, Marie PJ. Transforming growth factor beta2 inhibits adipocyte differentiation induced by skeletal unloading in rat bone marrow stroma. *J Bone Miner Res* 17: 668-677, 2002.
46. Yan T, Riggs BL, Boyle WJ, Khosla S. Regulation of osteoclastogenesis and RANK expression by TGF-beta1. *J Cell Biochem* 83: 320-325, 2001.
47. Lee KS, Kim HJ, Li QL, Chi XZ, Ueta C, Komori T, Wozney JM, Kim EG, Choi JY, Ryoo HM, Bae SC. Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol Cell Biol* 20: 8783-8792, 2000.

48. Zelzer E, Olsen BR., Multiple roles of vascular endothelial growth factor (VEGF) in skeletal development, growth, and repair. *Curr Top Dev Biol* 65: 169-187, 2005.
49. Kim SJ, Kim SY, Kwon CH, Kim YK. Differential effect of FGF and PDGF on cell proliferation and migration in osteoblastic cells. *Growth Factors* 25: 77-86, 2007.
50. Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H., Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem* 280: 33132-33140, 2005.
51. Bennett, C.N., K.A. Longo, W.S. Wright, L.J. Suva, T.F. Lane, K.D. Hankenson, and O.A. MacDougald, Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 3324-3329, 2005.
52. Bilezikian JP, Morishima A, Bell J, Grunbach MM. Increased bone mass as a result of estrogen therapy in a man with aromatase deficiency. *N Engl J Med* 339: 599-603, 1998.
53. Henriksen K, Neutzsky-Wulff AV, Bonewald LF, Karsdal MA. Local communication on and within bone controls bone remodeling. *Bone* 44:1026-1033, 2009.
54. Aubin JE, Bonnelye E. Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Osteoporos Int* 11: 905-913, 2000.

55. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacy DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 15: 2-12, 2000.
56. Khosla S. The OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 142: 5050-5055, 2001.
57. Theoleyre S, Wittrant Y, Kwan Tat S, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodelling. *Cytokine Growth Factor Reviews* 15: 457-475, 2004.
58. Browner WS, Lui LY, Cummings SR. Associations of serum osteoprotegerin levels with diabetes, stroke, bone density, fractures, and mortality in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 631-637, 2001.
59. Szulc P, Hofbauer LC, Heufelder AE, Roth S, Delmas PD. Osteoprotegerin serum levels in men: correlation with age, estrogen, and testosterone status. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 3162-3165, 2001.
60. Mulari MT, Qu Q, Härkönen PL, Väänänen HK. Osteoblast-like cells complete osteoclastic bone resorption and form new mineralized bone matrix in vitro. *Calcif Tissue Int* 75: 253-261, 2004.
61. Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T, Nishiwaki T, Suda T, Matsuo K. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metab* 4:111-121, 2006.
62. Karsdal MA, Fjording MS, Foged NT, Delaisse JM, Lochter A. Transforming growth factor-beta-induced osteoblast elongation regulates osteoclastic bone

- p>resorption through a p38 mitogen-activated protein kinase- and matrix metalloproteinase-dependent pathway.
- J Biol Chem*
- 276: 39350–39358, 2001.
63. Robinson JA, Riggs BL, Spelsberg TC, Oursler MJ. Osteoclasts and transforming growth factor-beta: estrogen-mediated isoform-specific regulation of production. *Endocrinology* 137: 615–621, 1996.
64. Karsdal MA, Neutzsky-Wulff AV, Dziegiel MH, Christiansen C, Henriksen K. Osteoclasts secrete non-bone derived signals that induce bone formation. *Biochem Biophys Res Commun* 366: 483–488, 2008.
65. Bellido T, Ali AA, Gubrij I, Plotkin LI, Fu Q, O'Brien CA, Manolagas SC, Jilka RL. Chronic elevation of parathyroid hormone in mice reduces expression of sclerostin by osteocytes: a novel mechanism for hormonal control of osteoblastogenesis. *Endocrinology* 146: 4577–4583, 2005.
66. Karsdal MA, Hjorth P, Henriksen K, Kirkegaard T, Nielsen KL, Lou H, Delaissé JM, Foged NT. Transforming growth factor-beta controls human osteoclastogenesis through the p38 MAPK and regulation of RANK expression. *J Biol Chem* 278: 44975–44987, 2003.
67. Philbrick WM, Wysolmersky JJ, Galbraith S, Holt E, Orloff JJ, Yang KH, Vasavada RC, Weir EC, Broadus AE, Stewart AF. Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. *Physiol Rev* 76: 127-173, 1996.
68. Iwamura M, Abrahamsson PA, di Sant'Agnese PA, Cockett AT, Deftos LJ. Parathyroid hormone-related protein is expressed by prostatic neuroendocrine cells. *Urology* 43: 667-764, 1994.

69. Martin TJ, Moseley JM, Williams DE. Parathyroid hormone-related protein: hormone and cytokine. *J Endocrinol* 154: 23-37, 1997.
70. Kartsogiannis V, Moseley J, McKelvie B, Chou ST, Hards DK, Ng KW, Martin TJ, Zhou H. Temporal expression of PTHrP during endochondral bone formation in mouse and intramembranous bone formation in an in vivo rabbit model. *Bone* 21: 385-392, 1997.
71. Amizuka N, Karaplis AC, Henderson JE, Warshawsky H, Lipman ML, Matsuki Y, Ejiri S, Tanaka M, Izumi N, Ozawa H, Goltzman D., Haploinsufficiency of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) results in abnormal postnatal bone development. *Dev Biol* 175: 166-176, 1996.
72. Whitfield JF. Parathyroid hormone-related protein (PTHrP): An ancient string of cytokines with many known and still unknown functions, in Novel aspects of PTHrP physiopathology, C. Luparello, Editor. Nova science publishers, Inc. 1-25, 271-305, 2007.
73. Martin TJ, Moseley JM, Williams DE. Parathyroid hormone-related protein: hormone and cytokine. *J Endocrinol* 154: 23-37, 1997.
74. Power DM, Ingleton PM, Flanagan J, Canario AV, Danks J, Elgar G, Clark MS. Genomic structure and expression of parathyroid hormone-related protein gene (PTHrP) in a teleost, *Fugu rubripes*. *Gene* 250: 67-76, 2000.
75. Orloff JJ, Readdy D, DePapp AE, Yang KH, Soifer EN. Parathyroid hormone-related protein as a prohormone: Posttranslational processing and receptor interactions. *Endocr Rev* 1: 40-60, 1994.
76. Jüppner H, Abou-Samra AB, Freeman M, Kong XF, Schipani E, Richards J, Kolakowski Jr LF, Hock J, Potts Jr JT, Kronenberg HM. A G proteinlinked

- p>receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide.
- Science*
- 254: 1024–1026, 1991.
77. Jüppner H. Molecular cloning and characterization of a parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor: a member of an ancient of G protein –coupled receptors. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 3: 371-378, 1994.
78. Abou-Samra AB, Jüppner H, Force T, Freeman MW, Kong XF, Schipani E, Ureña P, Richards J, Bonventre JV, Potts JT Jr, Kronenberg HM, Segre GV. Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: A single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol triphosphates and increases intracellular free calcium. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 2732-2736, 1992.
79. Friedman PA, Gesek FA, Morley P, Whitfield JF, Gillick GE. Cell-specific signalling and structure-actiity relations of parathyroid hormone analogs in mouse kidney cells. *Endocrinology* 140: 301-309, 1999.
80. Guo J, Lida-Klein A, Huang X, Abou-Samra AB, Segre GV, Brinhurst FR. Parathyroid hormone (PTH)/PTH related peptide density modulates activation of phospholipase C and phosphate transport by PTH in LLC-PK1 cells. *Endocrinology* 136: 3884-3891, 1995.
81. Takasu H, Guo J, Brinhurst F. Dual signalling and ligand selectivity of the human PTH/PTHrP receptor. *J Bone Miner Res* 14: 11-20, 1999.
82. Carpio L, Gladu J, Goltzman D, Rabbani SA. Induction of osteoblast differentiation indexes by PTHrP in MG-63 cells involves multiple signaling pathways. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E489-499, 2001.

83. Miao D, Tong XK, Chan GK, Panda D, McPherson PS, Goltzman D. Parathyroid hormone-related peptide stimulates osteogenic cell proliferation through protein kinase C activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Biol Chem* 276: 32204-32213, 2001.

84. De Gortázar AR, Alonso V, Alvarez-Arroyo MV, Esbrit P. Transient exposure to PTHrP (107-139) exerts anabolic effects through vascular endothelial growth factor receptor 2 in human osteoblastic cells *in vitro*. *Calcif Tissue Int.* 79: 360-369, 2006.

85. Fenton A. J., Kemp B.E., Hammonds R.G., Mitchelhill D., Moseley J.M, Martin T.J., Nicholson G.C. A potent inhibitor of osteoclastic bone resorption within a highly conserved peptapeptide region of PTHrP (107-111). *Endocrinology* 129: 3424-3426, 1991.

86. Orloff JJ, Ganz MB, Nathanson MH, Moyer MS, Kats Y, Mitnick M, Behal A, Gasalla-Herraiz J, Isales CM. A midregion parathyroid hormone-related protein mobilizes cytosolic calcium and stimulates formation of inositol triphosphate in a squamous carcinoma cell line. *Endocrinology* 137:5376-5385, 1996.

87. Valín A, Guillén C, Esbrit P. C-terminal parathyroid hormone-related protein (107-139) stimulates intracellular Ca^{2+} through a receptor different from the PTH/PTHrP receptor type 1 in osteoblastic osteosarcoma UMR-106 cells. *Endocrinology* 142: 2752-2759, 2001.

88. Dean T, Vilardaga JP, Potts JT, Gardella TJ. Altered selectivity of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein (PTHrP) for distinct conformations of the PTH/PTHrP receptor. *Mol Endocrinol* 22: 156-166, 2008.

89. Rouffet J, Coxam V, Gaumet N, Barlet JP. Preserved bone mass in ovariectomized rats treated with parathyroid-hormone-related peptide (1-34) and (107-111) fragments. *Reprod Nutr Dev* 34: 473-481, 1994.
90. Horwitz MJ, Tedesco MB, Gundberg C, Garcia-Ocana A, Stewart AF. Short-term, high-dose parathyroid hormone-related protein as a skeletal anabolic agent for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 569-575, 2003.
91. Stewart AF, Cain RL, Burr DB, Jacob D, Turner CH, Hock JM, Six-month daily administration of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein peptides to adult ovariectomized rats markedly enhances bone mass and biomechanical properties: a comparison of human parathyroid hormone 1-34, parathyroid hormone-related protein 1-36, and SDZ-parathyroid hormone 893. *J Bone Miner Res* 15: 1517-1525, 2000.
92. Stewart AF. PTHrP (1-36) as a skeletal anabolic agent for the treatment of osteoporosis. *Bone* 19: 303-306, 1996.
93. Jans DA, Thomas RJ, Gillespie T. Parathyroid hormone-related protein (PTHrP): a nucleocytoplasmic shuttling protein with distinct paracrine and intracrine roles. *Vitam Horm* 66: 345-384, 2003.
94. Fiaschi-Taesch NM, Stewart AF. Minireview: parathyroid hormone-related protein as an intracrine factor--trafficking mechanisms and functional consequences. *Endocrinology* 144: 407-411, 2003.
95. Boileau G, Tenenhouse HS, Desgroseillers L, Crine P. Characterization of PHEX endopeptidase catalytic activity: identification of parathyroid-hormone-related peptide 107-139 as a substrate and osteocalcin, PPi and phosphate as inhibitors. *Biochem J* 355: 707-713, 2001.

96. Fenton AJ, Kemp BE, Kent GN, Moseley JM, Zheng MH, Rowe DJ, Britto JM, Martin TJ, Nicholson GC. A carboxyl-terminal peptide from the parathyroid hormone-related protein inhibits bone resorption by osteoclasts. *Endocrinology* 129: 1762-1768, 1991.
97. Fenton AJ, Martin TJ, Nicholson GC. Long-term culture of disaggregated rat osteoclasts: inhibition of bone resorption and reduction of osteoclast-like cell number by calcitonin and PTHrP[107-139]. *J Cell Physiol* 155: 1-7, 1993.
98. Fenton AJ, Martin TJ, Nicholson GC. Carboxyl-terminal parathyroid hormone-related protein inhibits bone resorption by isolated chicken osteoclasts. *J Bone Miner Res* 9: 515-519, 1994.
99. Cornish J, Callon KE, Nicholson GC, Reid ir. Parathyroid hormone-related protein-(107-139) inhibits bone resorption in vivo. *Endocrinology* 138: 1299-1304, 1997.
100. Alonso V, de Gortazar AR, Ardura JA, Andrade-Zapata I, Alvarez-Arroyo MV, Esbrit P. Parathyroid hormone-related protein (107-139) increases human osteoblastic cell survival by activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *J Cell Physiol* 217: 717-727, 2008.
101. Burtis WJ. Evidence for the presence of an extreme carboxyterminal PTHrP in biological specimens. *J Bone Miner Res* 7 (Suppl 1): S225, 1992.
102. Maheshwari VV, Burton DW, Hastings RH, Aguilera JA, Pardo FS, Deftos LJ. Apoptotic effects of parathyroid hormone related protein in prostate cancer cells. *J Bone Min Res* 18: 119, 2003.
103. NIH consensus development panel on osteoporosis prevention, diagnosis and therapy. *JAMA* 285: 785-795, 2001.

104. Reginster JY, Burlet N. Osteoporosis: A still increasing prevalence *Bone* 38: 4-9, 2006,
105. Delmas PD, Fraser M. Strong bones in later life: Luxury or necessity? *Bulletin of the World Health Organization* 77, 1999.
106. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser* 843: 1-129, 1994.
107. Mirza F. Bone health and aging: implications for menopause. *Endocrinology and Metabolism Clinics* 33: 741-759, 2004.
108. Ebeling PR, Guthrie JR, Burger HG, Dennerstein L, Hopper JL, Wark JD. Bone turnover markers and bone density across the menopausal transition. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 3366–3371, 1996.
109. Riancho Moral JA, González Macías J. Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral. *Ed. MSD* 285-289, 2004.
110. Kuzuya T, Nakagawa S, Satoh J, Kanazawa Y, Iwamoto Y, Kobayashi M, Nanjo K, Sasaki A, Seino Y, Ito C, Shima K, Nonaka K, Kadowaki T. Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 55: 65–85, 2002.
111. Goday A, Carrera Santilliestra MJ, Puig de Dou J, Flores le Roux J, Chillaron JJ, Cano Pérez JF. Magnitud del problema: epidemiología del síndrome metabólico y de la diabetes tipo 2 en España. *Av Diabetol* 21: 63-70, 2005.
112. World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. *WHO/NCD/NCS/99.2* 17-24, 1999.

113. McCabe LR. Understanding the pathology and mechanisms of type I diabetic bone loss. *J Cell Biochem* 102: 1343-1357, 2007.
114. Buysschaert M, Cauwe F, Jamart J, Brichant C, De Coster P, Magnan A, Donckier J. Proximal femur density in type 1 and 2 diabetic patients. *Diabetes Metab* 18: 32–37, 1992.
115. Krakauer JC, McKenna MJ, Buderer NF, Rao DS, Whitehouse FW, Parfitt AM. Bone loss and bone turnover in diabetes. *Diabetes* 44: 775–782, 1995.
116. Munoz-Torres M, Jodar E, Escobar-Jimenez F, Lopez- Ibarra PJ, Luna JD. Bone mineral density measured by dual X-ray absorptiometry in Spanish patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Calcif Tissue Int* 58 : 316–319, 1996.
117. Tuominen JT, Impivaara O, Puukka P, Ronnema T. Bone mineral density in patients with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 22: 1196–1200, 1999.
118. Kemink SA, Hermus AR, Swinkels LM, Lutterman JA, Smals AG. Osteopenia in insulin-dependent diabetes mellitus; prevalence and aspects of pathophysiology. *J Endocrinol Invest* 23: 295–303, 2000.
119. Brown SA, Sharpless JL. Osteoporosis: An under-appreciated complication of diabetes. *Clin Diabetes* 22:10-20, 2004.
120. Karsenty G. Convergence between bone and energy homeostases: Leptin regulation of bone mass. *Cell Metab* 4: 341–348, 2006.
121. Rosen CJ, Bouxsein ML. Mechanisms of disease: Is osteoporosis the obesity of bone? *Nat Clin Pract Rheumatol* 2: 35–43, 2006.

122. Zhao LJ, Liu YJ, Liu PY, Hamilton J, Recker RR, Deng HW. Relationship of obesity with osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1640–1646, 2007.
123. Van Daele PI, Stolk RP, Burguer H, Algra D, Grobbee DE, Hofman A, Birkenhager JC, Pols HA. Bone density in non-insulin-dependent diabetes mellitus: The Rotterdam study. *Ann Intern Med* 122:409-414, 1995.
124. Hirano Y, Kishimoto H, Hagino H, Teshima R. The change of bone mineral density in secondary osteoporosis and vertebral fracture incidence. *J Bone Miner Metab* 17:119-124, 1999.
125. Heath HD, Melton LJD, Chu CP. Diabetes mellitus and risk of skeletal fracture. *N Engl J Med* 303: 567-570, 1980.
126. Seeley DJ, Kelsey J, Jergas M, Nevitt NC. Predictors of ankle and foot fractures in older women: the study of Osteoporotic Fracture Research Group. *J Bone Mineral Res* 11: 1347-1355, 1996.
127. Meyer HE, Tverdal A, Falch JA. Risk factors for hip fracture in middle-aged Norwegian women and men. *Am J Epidemiol* 137:1203–1211, 1993.
128. Forsen L, Meyer HE, Midthjell K, Edna TH. Diabetes mellitus and the incidence of hip fracture: Results from the Nord-Trondelag Health Survey. *Diabetologia* 42: 920–925, 1999.
129. Schwartz AV, Sellmeyer DE, Ensrud KE, Cauley JA, Tabor HK, Schreiner PJ, Jamal SA, Black DM, Cummings Levin ME, Boisseau VC, Avioli LV. Effects of diabetes mellitus on bone mass in juvenile and adult-onset diabetes. *N Engl J Med* 294: 241–245, 1976.

130. Miao J, Brismar K, Nyren O, Ugarph-Morawski A, Ye W. Elevated hip fracture risk in type 1 diabetic patients: A population-based cohort study in Sweden. *Diabetes Care* 28: 2850–2855, 2005.
131. Strotmeyer ES, Cauley JA, Orchard TJ, Steenkiste AR, Dorman JS. Middle-aged premenopausal women with type 1 diabetes have lower bone mineral density and calcaneal quantitative ultrasound than nondiabetic women. *Diabetes Care* 29: 306–311, 2006.
132. Auwerx J, Dequeker J, Bouillon R, Geusens P, Nijs J. Mineral metabolism and bone mass at peripheral and axial skeleton in diabetes mellitus. *Diabetes* 37: 8–12, 1988.
133. Nicodemus KK, Folsom AR. Type 1 and type 2 diabetes and incident hip fractures in postmenopausal women. *Diabetes Care* 24: 1192–1197, 2001.
134. Hofbauer LC, Brueck CC, Singh SK, Dobnig H. Osteoporosis in Patients with Diabetes Mellitus. *J Bone Miner Res* 22: 1317–1328, 2007.
135. Cloos C, Wahl P, Hasslacher C, Traber L, Kistner M, Jurkuhn K, Schmidt-Gayk H. Urinary glycosylated, free and total pyridinoline and free and total deoxypyridinoline in diabetes mellitus. *Clin Endocrinol (Oxf)* 48: 317–323, 1998.
136. Koh AJ, Demiralp B, Neiva KG, Hooten J, Nohutcu RM, Shim H, Datta NS, Taichman RS, McCauley LK. Cells of the osteoclast lineage as mediators of the anabolic actions of parathyroid hormone in bone. *Endocrinology* 146: 4584–4596, 2005.
137. Botolin S, Faugere MC, Malluche H, Orth M, Meyer R, McCabe LR. Increased bone adiposity and peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma2 expression in type I diabetic mice. *Endocrinology* 146: 3622–3631, 2005.

138. Botolin S, McCabe L. Bone loss and increased bone adiposity in spontaneous and pharmacologically induced diabetic mice. *Endocrinology* 148: 198–205, 2007.
139. McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell* 6: 483–495, 2004.
140. Kindblom JM, Gevers EF, Skrtic SM, Lindberg MK, Gothe S, Tornell J, Vennstrom B, Ohlsson C. Increased adipogenesis in bone marrow but decreased bone mineral density in mice devoid of thyroid hormone receptors. *Bone* 36: 607–616, 2005.
141. Irwin R, Lin HV, Motyl KJ, McCabe LR. Normal bone density obtained in the absence of insulin receptor expression in bone. *Endocrinology* 147: 5760–5767, 2006.
142. Jilka RL, Weinstein RS, Takahashi K, Parfitt AM, Manolagas SC. Linkage of decreased bone mass with impaired osteoblastogenesis in a murine model of accelerated senescence. *J Clin Invest* 97: 1732–1740, 1996.
143. Nuttall ME, Gimble JM. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. *Curr Opin Pharmacol* 4: 290–294, 2004.
144. Glajghen N, Epstein S, Ismail F, Thomas S, Fallon M, Chakrabarti S. Bone mineral metabolism in experimental diabetes mellitus: Osteocalcin as a measure of bone remodeling. *Endocrinology* 123: 290–295, 1988.

145. Campos Pastor MM, López-Ibarra PJ, Escobar-Jiménez F, Serrano Pardo MD, García-Cervigon AG. Intensive insulin therapy and bone mineral density in type 1 diabetes mellitus: a prospective study. *Osteoporos Int* 11: 455-459, 2000.
146. Ahmed LA, Joakimsen RM, Berntsen GK, Fonnebo V, Schirmer H. Diabetes mellitus and the risk of non-vertebral fractures: the Tromso study. *Osteoporos Int* 17: 495-500, 2006.
147. Scheiwiller E, Guler HP, Merryweather J, Scandella C, Maerki W, Zapf J, Froesch ER. Growth restoration of insulin-deficient diabetic rats by recombinant human insulin-like growth factor I. *Nature* 323: 169-171, 1986.
148. Rosen JC, Bilezikian JP. Anabolic Therapy for osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 957-964, 2001.
149. Young AA. AMY's physiology and its role in diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabet* 4: 282-290, 1997.
150. Reid IR, Cornish J, Baldock PA. Nutrition-related peptides and bone homeostasis. *J Bone Miner Res* 21: 495-500, 2006.
151. Burguera B, Hofbauer L, Thomas T, Gori F, Lassam J, Laasko K., et al. Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats. *Endocrinology* 142: 3546-3553, 2001.
152. Quesada Gómez JM. Leptina y hueso: mecanismos moleculares de la interacción leptina-osteoblasto. *REEMO* 15: 24-29, 2006.
153. Cornish J, Callon K, Bava U, Grey A, Xu X, Buchanan CM, Cooper GJS, Reid IR. The novel hormone, preptin, is another bone-active product of pancreatic beta cell. *J Bone Miner Res* 17: S428, 2002.

154. Bolag RJ, Zhong Q, Ding KH, Phillips P, Zhong L, Qin F, Crandford J, Mulloy AL, Cameron R, Isaacs CM. Glucose-dependent insulinotropic peptide is an integrative hormone with osteotropic effects. *Mol Cell Endocrinol* 177: 35-41, 2001.
155. Henriksen DB. The gut feeling of bone remodeling. *BoneKEy-Osteovision* 2: 16-23, 2005.
156. Nuche-Berenguer B, Moreno P, Esbrit P, Dapía S, Caeiro JR, Cancelas J, Haro-Mora JJ, Villanueva-Peñacarrillo ML. Effect of GLP-1 treatment on bone turnover in normal, type 2 diabetic, and insulin-resistant states. *Calcif Tissue Int* 84: 453-461, 2009.
157. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV Jr, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA, Filvaroff EH. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 9656-9661, 2002.
158. Amir G, Rosenmann E, Sherman Y, Greenfeld Z, Ne'eman Z, Cohen AM. Osteoporosis in the Cohen diabetic rat: Correlation between histomorphometric changes in bone and microangiopathy. *Lab Invest* 82: 1399-1405, 2002.
159. Nyomba BI, Verhaeghe J, Thomasset M, Lissens W, Bouillon R. Bone mineral homeostasis in spontaneously diabetic rats BB. I. Abnormal vitamin D metabolism and impaired active intestinal calcium absorption. *Endocrinology* 124: 1452-1454, 1983.
160. Inaba M, Nishizawa Y, Mita K, Kumeda Y, Emoto M, Kawasgishi T, Ishimura E, Nakatsuka K, Shioi A, Morii H. Poor glycemic control impairs the response of biochemical parameters of bone formation and resorption to exogenous 1,25-

- dihydroxyvitamin D3 in patients with diabetes type 2. *Osteoporos Int* 9: 525-531, 1999.
161. Cauley JA, Seeley DG, Ensrud K, Ettinger B, Black D, Cummings SR. Estrogen replacement therapy and fractures in older women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Ann Intern Med* 122: 9-16, 1995.
162. Prestwood, K.M., A.M. Kenny, C. Unson, and M. Kulldorff, The effect of low dose micronized 17ss-estradiol on bone turnover, sex hormone levels, and side effects in older women: a randomized, double blind, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4462-4469, 2000.
163. Shang Y, Brown M. Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science* 295: 2465-2468, 2002.
164. Draper MW, Flowers DE, Huster WJ, Neild JA, Harper KD, Arnaud C. A controlled trial of raloxifene (LY139481) HCl: impact on bone turnover and serum lipid profile in healthy postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 11: 835-842, 1996.
165. Russell RG. Bisphosphonates: from bench to bedside. *Ann N Y Acad Sci* 1068: 367-401, 2006.
166. Reid IR, Brown JP, Burckhardt P, Horowitz Z, Richardson P, Trechsel U, Widmer A, Devogelaer JP, Kaufman JM, Jaeger P, Body JJ, Brandi ML, Broell J, Di Micco R, Genazzani AR, Felsenberg D, Happ J, Hooper MJ, Ittner J, Leb G, Mallmin H, Murray T, Ortolani S, Rubinacci A, Saaf M, Samsioe G, Verbruggen L, Meunier PJ. Intravenous zoledronic acid in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med* 346: 653-661, 2002.

167. Selye H. On the stimulation of new bone formation with parathyroid extract and irradiated ergosterol. *Endocrinology* 16: 547-558, 1932.
168. Cosman F. Parathyroid hormone treatment for osteoporosis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 15: 495-501, 2008.
169. Frolik CA, Black EC, Cain RL, Satterwhite JH, Brown-Augsburger PL, Sato M, Hock JM. Anabolic and catabolic bone effects of human parathyroid hormone (1-34) are predicted by duration of hormone exposure. *Bone* 33: 372-379, 2003.
170. Gasser JA, Kneissel M, Thomsen JS, Mosekilde L. PTH and interactions with bisphosphonates. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 1: 53-56, 2000.
171. Li X, Ominsky MS, Warmington KS, Morony S, Gong J, Cao J, Gao Y, Shalhoub V, Tipton B, Haldankar R, Chen Q, Winters A, Boone T, Geng Z, Niu QT, Ke HZ, Kostenuik PJ, Simonet WS, Lacey DL, Paszty C. Sclerostin antibody treatment increases bone formation, bone mass, and bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 24: 578-588, 2009.
172. Yaccoby S, Ling W, Zhan F, Walker R, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr. Antibody-based inhibition of DKK1 suppresses tumor-induced bone resorption and multiple myeloma growth in vivo. *Blood* 109: 2106-2111, 2007.
173. Warden SJ, Robling AG, Haney EM, Turner CH, Bliziotes MM. The emerging role of serotonin (5-hydroxytryptamine) in the skeleton and its mediation of the skeletal effects of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5). *Bone* 46: 4-12, 2010.
174. McClung MR, Lewiecki EM, Cohen SB, Bolognese MA, Woodson GC, Moffett AH, Peacock M, Miller PD, Lederman SN, Chesnut CH, Lain D, Kivitz AJ,

- Holloway DL, Zhang C, Peterson MC, Bekker PJ; AMG 162 Bone Loss Study Group. Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med* 354: 821–831, 2006.
175. Miao D, Su H, He B, Gao J, Xia Q, Zhu M, Gu Z, Goltzman D, Karaplis AC. Severe growth retardation and early lethality in mice lacking the nuclear localization sequence and C-terminus of PTH-related protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 20309-20314, 2008
176. Fernández de Castro L, Lozano D, Dapía S, Portal-Nuñez S, Caeiro JR, Gomez-Barrena E, Esbrit P. Role of the N- and C-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein as putative therapies to improve bone regeneration under high glucocorticoid treatment. *Tissue Eng Part A* 16: 1157-1168, 2010.
177. Centrella M, Canalis E, McCarthy TL, Stewart AF, Orloff JJ, Insogna KL. Parathyroid hormone-related protein modulates the effect of transforming growth factor-beta on deoxyribonucleic acid and collagen synthesis in fetal rat bone cells. *Endocrinology* 125: 199-208, 1989.
178. Esbrit P, Alvarez-Arroyo MV, De Miguel F, Martin O, Martinez ME, Caramelo C. C-terminal parathyroid hormone-related protein increases vascular endothelial growth factor in human osteoblastic cells. *J Am Soc Nephrol* 11: 1085-1092, 2000.
179. Deschaseaux F, Sensébé L, Heymann D. Mechanisms of bone repair and regeneration. *Trends Mol Med* 15:417-429, 2009.
180. Siddappa R, Martens A, Doorn J, Leusink A, Olivo C, Licht R, van Rijn L, Gaspar C, Fodde R, Janssen F, van Blitterswijk C, de Boer J. cAMP/PKA

- pathway activation in human mesenchymal stem cells *in vitro* results in robust bone formation *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 7281–7286, 2008.
181. Kulkarni NH, Wei T, Kumar A, Dow ER, Stewart TR, Shou J, N'cho M, Sterchi DL, Gitter BD, Higgs RE, Halladay DL, Engler TA, Martin TJ, Bryant HU, Ma YL, Onyia JE. Changes in osteoblast, chondrocyte, and adipocyte lineages mediate the bone anabolic actions of PTH and small molecule GSK-3 inhibitor. *J Cell Biochem* 102: 1504–1518, 2007.
 182. Heath DJ, Chantry AD, Buckle CH, Coulton L, Shaughnessy JD Jr, Evans HR, Snowden JA, Stover DR, Vanderkerken K, Croucher PI. Inhibiting Dickkopf-1 (Dkk1) removes suppression of bone formation and prevents the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *J Bone Miner Res* 24: 425–436, 2009.
 183. Einhorn TA, Majeska RJ, Rush EB, Levine PM, Horowitz MC. The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res* 10: 1272–1281, 1995.
 184. Kim SJ, Shin YW, Yang KH, Kim SB, Yoo MJ, Han SK, Im SA, Won YD, Sung YB, Jeon TS, Chang CH, Jang JD, Lee SB, Kim HC, Lee SY. A multi-center, randomized, clinical study to compare the effect and safety of autologous cultured osteoblast (Ossron) injection to treat fractures. *BMC Musculoskelet Disord* 10: 20, 2009.
 185. Nunamaker DM. Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* 355: S56–65, 1998.
 186. Holstein JH, Garcia P, Histing T, Kristen A, Scheuer C, Menger MD, Pohlemann T. Advances in the establishment of defined mouse models for the study of fracture healing and bone regeneration. *J Orthop Trauma* 23: S31–38, 2009.

187. Bab IA. Postablation bone marrow regeneration: an in vivo model to study differential regulation of bone formation and resorption. *Bone* 17: 437S-441S, 1995.
188. Jacobsen KA, Al-Aql ZS, Wan C, Fitch JL, Stapleton SN, Mason ZD, Cole RM, Gilbert SR, Clemens TL, Morgan EF, Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Bone formation during distraction osteogenesis is dependent on both VEGFR1 and VEGFR2 signaling. *J Bone Miner Res* 23: 596–609, 2008.
189. Shimizu T, Mehdi R, Yoshimura Y, Yoshikawa H, Nomura S, Miyazono K, Takaoka K. Sequential expression of bone morphogenetic protein, tumor necrosis factor, and their receptors in bone-forming reaction after mouse femoral marrow ablation. *Bone* 23: 127-133, 1998.
190. Kondo N, Tokunaga K, Ito T, Arai K, Amizuka N, Minqi L, Kitahara H, Ito M, Naito M, Shu-Ying J, Oda K, Murai T, Takano R, Ogose A, Endo N. High dose glucocorticoid hampers bone formation and resorption after bone marrow ablation in rat. *Microsc Res Tech* 69: 839-846, 2006.
191. Lu H, Kraut D, Gerstenfeld LC, Graves DT. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. *Endocrinology* 144: 346-352, 2003.
192. Okuda N, Takeda S, Shinomiya K, Muneta T, Itoh S, Noda M, Asou Y. ED-71, a novel vitamin D analog, promotes bone formation and angiogenesis and inhibits bone resorption after bone marrow ablation. *Bone* 40: 281-292, 2007.
193. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater* 13: 1-10, 2007.

194. Katthagen BD. Bone regeneration with bone substitutes. An animal study. Berlin: Springer Verlag, 1986.
195. Vallet-Regí M. Evolution of bioceramics within the field of biomaterials. *Comptes Rendus Chimie* 13: 174-185, 2010.
196. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 29: 2941-2953, 2008.
197. Kwong FN, Harris MB. Recent developments in the biology of fracture repair. *J Am Acad Orthop Surg* 16: 619-625, 2008.
198. Canalis E. Effect of Growth-Factors on Bone Cell Replication and Differentiation. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 193: 246-263, 1985.
199. Joyce ME, Jingushi S, Bolander ME. Transforming Growth Factor-Beta in the Regulation of Fracture Repair. *Orthopedic Clinics of North America* 21: 199-204, 1990.
200. Williams DF. On the nature of biomaterials. *Biomaterials* 30: 5897-5909, 2009.
201. Vallet-Regí M. Nanostructured mesoporous silica matrices in nanomedicine. *J Intern Med* 267: 22-43, 2010.
202. Manzano M, Colilla M, Vallet-Regí M. Drug delivery from ordered mesoporous matrices. *Expert Opin Drug Deliv* 6: 1383-1400, 2009.
203. Zhao D, Feng J, Huo Q, Melosh N, Fredrickson GH, Chmelka BF, Stucky GD. Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores. *Science* 279: 548-552, 1998.

204. Vallet-Regí M. Revisiting ceramics for medical applications. *Dalton Trans* 28: 5211-5220, 2006.
205. Balas F, Manzano M, Colilla M, Vallet-Regí M. L-Trp adsorption into silica mesoporous materials to promote bone formation. *Acta Biomater* 4: 514-522, 2008.
206. Vallet-Regí M. Ordered mesoporous materials in the context of drug delivery systems and bone tissue engineering. *Chem Eur J* 12: 5934-5943, 2006.
207. Vallet-Regí M, Balas F, Colilla M, Manzano M. Bone-regenerative bioceramic implants with drug and protein controlled delivery capability. *Progress in Solid State Chemistry* 36: 163-191, 2008.
208. Zhao D, Huo Q, Fena J, Chmelka BF, Stucky GD. Non ionic triblock and star diblock copolymer and oligomeric surfactant synthesis of highly ordered, hydrothermally stable, mesoporous silica structures. *J Am Chem Soc* 120: 6024-6036, 1998.
209. Zambonin G, Camerino C, Greco G, Patella V, Moretti B, Grano M. Hydroxyapatite coated with hepatocyte growth factor (HGF) stimulates human osteoblasts *in vitro*. *J Bone Joint Surg* 82: 457-460, 2000.
210. Zambonin G, Grano M, Greco G, Oreffo ROC, Triffit JT. Hydroxyapatite coated with insulin-like growth factor 1 (IGF1) stimulates human osteoblast activity *in vitro*. *Acta Orthop Scand* 70: 217-220, 1999.
211. Esbrit P, Benítez-Verguizas J, de Miguel F, Valín A, García-Ocaña A. Characterization of parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor and signaling in hypercalcemic Walker 256 tumor cells. *J Endocrinol*; 166:11-20, 2000.

212. Hoemann CD, Sun J, McKee MD, Chevrier A, Rossomacha E, Rivard GE, Hurtig M, Buschmann MD. Chitosan-glycerol phosphate/blood implants elicit hyaline cartilage repair integrated with porous subchondral bone in microdrilled rabbit defects. *Osteoarthritis Cartilage* 15: 78-89, 2007.
213. Valín A, García-Ocaña A, de Miguel F, Sarasa JL, Esbrit P. Antiproliferative effect of the C-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein, PTHrP-(107-111) and (107-139), on osteoblastic osteosarcoma cells. *J Cell Physiol* 170: 209-215, 1997.
214. McDonald IM, Austin C, Buck IM, Dunstone DJ, Gaffen J, Griffin E, Harper EA, Hull RA, Kalindjian SB, Linney ID, Low CM, Patel D, Pether MJ, Raynor M, Roberts SP, Shaxted ME, Spencer J, Steel KI, Sykes DA, Wright PT, Xun W. Discovery and characterization of novel, potent, non-peptide parathyroid hormone-1 receptor antagonists. *Med Chem* 50: 4789 -4792, 2007.
215. Iida-Klein A, Lu SS, Yokoyama K, Dempster DW, Nieves JW, Lindsay R. Precision, accuracy, and reproducibility of dual X-ray absorptiometry measurements in mice in vivo. *J Clin Densitom* 6: 25-33, 2003.
216. Feldkamp LA, Davis LC, Kress JW. Practical cone-beam algorithm. *J Opt Soc Am A* 1: 612-619, 1984.
217. Ulrich D, van RB, Laib A, Ruegsegger P. The ability of three-dimensional structural indices to reflect mechanical aspects of trabecular bone. *Bone* 25: 55-60, 1999.
218. Odgaard A. Three-dimensional methods for quantification of cancellous bone architecture. *Bone* 20: 315-328, 1997.

219. Mattsson G, Carlsson PO, Olausson K, Jansson L. Histological markers for endothelial cells in endogenous and transplanted rodent pancreatic islets. *Pancreatology* 2: 155-162, 2002.
220. Wada S, Yasuda S, Nagai T, Maeda T, Kitahama S, Suda S, Findlay DM, Iitaka M, Katayama S. Regulation of calcitonin receptor by glucocorticoid in human osteoclast-like cells prepared in vitro using receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and macrophage colony-stimulating factor. *Endocrinology* 142: 1471-148, 2001.
221. Jilka RL, Weinstein RS, Parfitt AM, Manolagas SC. Quantifying osteoblast and osteocyte apoptosis: challenges and rewards. *J Bone Miner Res* 22: 1492-1501, 2007.
222. Sottile V, Halleux C, Bassilana F, Keller H, Seuwen K. Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. *Bone* 30: 699-704, 2002.
223. Lee CH, Shin HJ, Cho IH, Kang YM, Kim IA, Park KD, Shin JW. Nanofiber alignment and direction of mechanical strain affect the ECM production of human ACL fibroblast. *Biomaterials* 26: 1261-1270, 2005.
224. Izquierdo A, López-Luna P, Ortega A, Romero M, Gutiérrez-Tarrés MA, Arribas I, Álvarez MJ, Esbrit P, Bosch RJ. The parathyroid hormone-related protein system and diabetic nephropathy outcome in streptozotocin-induced diabetes. *Kidney Int* 12: 2171-2177, 2006.
225. Towler DA. Vascular biology and bone formation: hints from HIF. *J Clin Invest* 117: 1477-1480, 2007.
226. Vaes BL, Ducy P, Sijbers AM, Hendriks JM, van Someren EP, de Jong NG, van den Heuvel ER, Olijve W, van Zoelen EJ, Decherling KJ. Microarray analysis on

- Runx2-deficient mouse embryos reveals novel Runx2 functions and target genes during intramembranous and endochondral bone formation. *Bone* 39: 724-738, 2006.
227. Schiller PC, D'ippolito G, Roos BA, Howard GA. Anabolic or catabolic responses of MC3T3-E1 osteoblastic cells to parathyroid hormone depend on time and duration of treatment. *J Bone Miner Res* 14: 1504-1512, 1999.
 228. Fujita T, Fukuyama R, Izumo N, Hirai T, Meguro T, Nakamura H, Koida M. Transactivation of core binding factor $\alpha 1$ as a basic mechanism to trigger parathyroid hormone-induced osteogenesis. *Jpn J Pharmacol* 86: 405-416, 2001.
 229. Datta NS, Pettway GJ, Chen C, Koh AJ, McCauley LK. Cyclin D1 as a target for the proliferative effects of PTH and PTHrP in early osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 22: 951-964, 2007.
 230. Rámila D, Ardura JA, Esteban V, Ortega A, Ruiz-Ortega M, Bosch RJ, Esbrit P. Parathyroid hormone-related protein promotes inflammation in the mouse obstructed kidney. *Kidney Int* 73: 835-847, 2008.
 231. Balas F, Manzano M, Horcajada P, Vallet-Regí M. Confinement and controlled release of bisphosphonates on ordered mesoporous silica-based materials. *J Am Chem Soc* 128: 8116-8117, 2006.
 232. Crank J. The mathematics of diffusion. 2nd ed. Oxford University Press: Oxford. 1975.
 233. Costa P, Sousa-Lobo JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci* 13: 123-133, 2001.

234. Vallet-Regí M, Ruiz-González L, Izquierdo I, González-Calbet J M. Revisiting silica based ordered mesoporous materials: medical applications. *J Mater Chem* 16: 26-31, 2006.
235. Mulye NV, Turco SJ. A simple-model based on first-order kinetics to explain release of highly water-soluble drugs from porous dicalcium phosphate dihydrate matrices. *Drug Dev Ind Pharm* 21: 943-953, 1995.
236. Nieto A, Balas F, Colilla M, Manzano M, Vallet-Regí M. Functionalization degree of SBA-15 as key factor to modulate sodium alendronate dosage. *Micropor Mesopor Mater* 116: 4-13, 2008.
237. Liu Z, Terasaki O, Ohsuna T, Hiraga K, Shin HJ, Ryoo R. An HREM study of channel structures in mesoporous silica SBA-15 and platinum wires produced in the channels. *Chem Phys Chem* 2: 229-231, 2001.
238. Manzano M, Aina V, Arean CO, Balas F, Cauda V, Colilla M, Delgado MR, Vallet-Regí M. Studies on MCM-41 mesoporous silica for drug delivery: Effect of particle morphology and amine functionalisation. *Chem Eng J* 137: 30-37, 2008.
239. Martínez P, Esbrit P, Rodrigo A, Alvarez-Arroyo MV, Martínez ME. Age-related changes in parathyroid hormone-related protein and vascular endothelial growth factor in human osteoblastic cells. *Osteoporosis Int* 13:874–81, 2002.
240. Carnevale V, Romagnoli E, D'Erasmus E. Skeletal involvement in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev* 20: 196–204, 2004.
241. Maor G, Karnieli E. The insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) is involved in early bone growth in control and diabetic mice, but is regulated through the insulin-like growth factor I receptor. *Endocrinology* 140: 1841–851, 1999.

242. Celil AB, Hollinger JO, Campbell PG. Osx transcriptional regulation is mediated by additional pathways to BMP2/Smad signalling. *J Cell Biochem* 95: 518–528, 2005.
243. Botolin S, McCabe LR. Chronic hyperglycemia modulates osteoblast gene expression through osmotic and non-osmotic pathways. *J Cell Biochem* 99: 411–424, 2006.
244. Hamada Y, Kitazawa S, Kitazawa R, Fujii H, Kasuga M, Fukagawa M. Histomorphometric analysis of diabetic osteopenia in streptozotocin-induced diabetic mice: a possible role of oxidative stress. *Bone* 40: 1408–1414, 2007.
245. Silva MJ, Brodt MD, Lynch MA, McKenzie JA, Tanouye KM, Nyman JS, Wang X. Type 1 diabetes in young rats leads to progressive trabecular bone loss, cessation of cortical bone growth, and diminished whole bone strength and fatigue life. *J Bone Miner Res* 24: 1618-1627, 2009.
246. Wittrant Y, Gorin Y, Woodruff K, Horn D, Abboud HE, Mohan S, Abboud-Werner SL. High D(+)glucose concentration inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis. *Bone* 42: 1122-1130, 2008.
247. Miao D, He B, Jiang Y, Kobayashi T, Sorocéanu MA, Zhao J, Su H, Tong X, Amizuka N, Gupta A, Genant HK, Kronenberg HM, Goltzman D, Karaplis AC. Osteoblast-derived PTHrP is a potent endogenous bone anabolic agent that modifies the therapeutic efficacy of administered PTH 1-34. *J Clin Invest* 115: 2402-2411, 2005.
248. Bisello A, Horwitz MJ, Stewart AF. Parathyroid hormone-related protein: an essential physiological regulator of adult bone mass. *Endocrinology* 145: 3551–3553, 2004.

249. Pfeilschifter J, Diel I, Pilz U, Brunotte K, Naumann A, Ziegler R. Mitogenic responsiveness of human bone cells in vitro to hormones and growth factors decreases with age. *J Bone Miner Res* 8: 707–717, 1993.
250. Benjamin LE. Glucose, VEGF-A, and diabetic complications. *Am J Pathol* 158: 1181–1184, 2001.
251. Cornish J, Callon KE, Lin C, Xiao C, Moseley JM, Reid IR. Stimulation of osteoblast proliferation by C-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein. *J Bone Miner Res* 14: 915-922, 1999.
252. Chen HL, Demiralp B, Schneider A, Koh AJ, Silve C, Wang CY, McCauley LK. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein exert both pro- and anti-apoptotic effects in mesenchymal cells. *J Biol Chem* 277: 19374-19381, 2002.
253. Chen C, Koh AJ, Datta NS, Zhang J, Keller ET, Xiao G, Franceschi RT, D'Silva NJ, McCauley LK. Impact of the mitogen-activated protein kinase pathway on parathyroid hormone-related protein actions in osteoblasts. *J Biol Chem* 279: 29121-29129, 2004.
254. Thomas DM, Hards DK, Rogers SD, Ng KW, Best JD. Insulin receptor expression in bone. *J Bone Miner Res* 11: 1312–1320, 1996.
255. Fulzele K, DiGirolamo DJ, Liu Z, Xu J, Messina JL, Clemens TI. Disruption of the insulin-like growth factor type 1 receptor in osteoblasts enhances insulin signalling and action. *J Biol Chem* 282: 25649–25658, 2007.
256. Fang Y, Wang ZY, Mao Y, Xin HT, Ren GL, Bai XF. Effects of insulinlike growth factor I on the development of osteoblasts in hyperglycemia. *Diabetes Res Clin Pract* 73: 95–97, 2006.

257. Balint E, Szabo P, Marshall CF, Sprague SM. Glucose-induced inhibition of in vitro bone mineralization. *Bone* 28: 21–28, 2001.
258. Ogawa N, Yamaguchi T, Yano S, Yamauchi M, Yamamoto M, Sugimoto T. The combination of high glucose and advanced glycation endproducts (AGEs) inhibits the mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells through glucose-induced increase in the receptor for AGEs. *Horm Metab Res* 39: 871–875, 2007.
259. Terada M, Inaba M, Yano Y, Hasuma T, Nishizawa Y, Morii H, Otani S. Growth-inhibitory effect of high glucose concentration on osteoblast-like cells. *Bone* 22: 17–23, 1998.
260. Martínez ME, García-Ocaña A, Sánchez M, Medina S, del Campo T, Valín A, Sanchez-Cabezudo MJ, Esbrit P. C-terminal parathyroid hormone-related protein inhibits proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 12: 778-785, 1997.
261. Cuthbertson RM, Kemp BE, Barden JA. Structure study of osteostatin PTHrP[Thr107](107-139). *Biochim Biophys Acta* 1432: 64-72, 1999.
262. Guillén C, Martínez P, de Gortázar AR, Martínez ME, Esbrit P. Both N- and C-terminal domains of parathyroid hormone-related protein increase interleukin-6 by NF- κ B activation in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 277: 28109-28117, 2002.
263. Kosmulski M. PH-dependent surface charging and points of zero charge. II.Update. *J Colloid Interface Sci* 275: 214–224, 2004.
264. Rihani-Basharat S, Lewinson D. PTHrP (107–111) inhibits in vivo resorption that was stimulated by PTHrP (1–34) when applied intermittently to neonatal mice. *Calcif Tissue Int* 61: 426–428, 1997.

265. Hing KA, Wilson LF, Buckland T. Comparative performance of three ceramic bone graft substitutes. *Spine J* 7: 475-490, 2007.
266. Bostrom MP, Gamradt SC, Asnis P, Vickery BH, Hill E, Avnur Z, Waters RV. Parathyroid hormone-related protein analog RS-66271 is an effective therapy for impaired bone healing in rabbits on corticosteroid therapy. *Bone* 26: 437-442, 2000.
267. Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone* 19: 1S-12S, 1996.
268. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 36: 1392-1404, 2005.
269. Kloen P, Di Paola M, Borens O, Richmond J, Perino G, Helfet DL, Goumans MJ. BMP signaling components are expressed in human fracture callus. *Bone* 33: 362-371.
270. Fang J, Zhu YY, Smiley E, Bonadio J, Rouleau JP, Goldstein SA, McCauley LK, Davidson BL, Roessler BJ. Stimulation of new bone formation by direct transfer of osteogenic plasmid genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 5753-5758, 1996.
271. Okazaki K, Jingushi S, Ikenoue T, Urabe K, Sakai H, Iwamoto Y. Expression of parathyroid hormone-related peptide and insulin-like growth factor I during rat fracture healing. *J Orthop Res* 21: 511-520, 2003.

8. Anexo

8. ANEXO

8.1 Artículos publicados

- **Lozano D**, Fernández de Castro L, Esbrit P, Alvarez-Arroyo MV. Diabetes mellitus y pérdida de masa ósea. *REEMO* 16: 29-33, 2007.
- **Lozano D**, de Castro LF, Dapía S, Andrade-Zapata I, Manzarbeitia F, Alvarez-Arroyo MV, Gómez-Barrena E, Esbrit P. Role of Parathyroid Hormone-Related Protein in the Decreased Osteoblast Function in Diabetes-Related Osteopenia. *Endocrinology* 150: 2027-2035, 2009. Índice de impacto: 4,945.
- **Daniel Lozano**, Miguel Manzano, Juan Carlos Doadrio, Antonio J. Salinas, María Vallet-Regí, Enrique Gómez-Barrena, Pedro Esbrit. Osteostatin-loaded bioceramics stimulate osteoblastic growth and differentiation. *Acta Biomater* 6: 797-803, 2010. Índice de impacto: 3,727.
- Fernández de Castro L, **Lozano D**, Dapía S, Portal-Núñez S, Caeiro JR, Gómez-Barrena E, Esbrit P. Role of the N- and C-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein as putative therapies to improve bone regeneration under high glucocorticoid treatment. *Tissue Eng part A* 16: 1157-1168, 2010. Índice de impacto: 4,697.
- Portal-Núñez S, **Lozano D**, Fernández de Castro L, de Gortazar AR, Nogués X, Esbrit P. Alterations of the Wnt/b-catenin pathway and its target genes for the N- and C-terminal domains of parathyroid hormone-related protein in bone from diabetic mice. *FEBS Letters* (en prensa). Índice de impacto: 3,264.
- **Lozano D**, Fernández de Castro L, Portal-Núñez S, López-Herradón A, Dapía S, Gómez-Barrena E, Esbrit P. The C-terminal fragment of parathyroid hormone-related protein promotes bone formation in diabetic mice with low turnover osteopenia. *British Journal of Pharmacology* (Provisionalmente aceptado y en revision). Índice de impacto: 4,902

- Fernández de Castro L, **Lozano D**, Portal-Núñez S, Gaude D, Mariñoso ML, Corcuera M, Esbrit P. Comparison of the skeletal effects induced by daily administration of PTHrP (1-36) and PTHrP (107-139) to ovariectomized mice. *Journal of Orthopaedic Research* (enviado y en revisión). Índice de impacto: 2,963.
- **Lozano D**, Trejo CG, Salinas AJ, Dapia S, Vallet-Regí M, Esbrit P, Gómez-Barrena E, Buján J. PTHrP (107-111) Loaded Into Mesoporous Bioceramics Improves Bone Regeneration Following A Cavitary Defect In Rabbits (en preparación).

8.2 Premios y becas

- Premio a la mejor presentación oral del XVII Congreso de la Sociedad Europea de Investigación en Ortopedia (EORS). Madrid, Abril de 2008.
- Beca otorgada por el Fondo para la Cooperación Europea en el campo de la Investigación Técnica y Científica para asistir al *Training School* sobre Laboratorios para la Mejora de Técnicas Médicas en la Práctica Clínica asociadas a Prótesis, en Oporto (Portugal), Junio de 2008.
- Beca (patrocinada por Roche-GSK) de viaje otorgada por la Sociedad Española de Investigación Ósea y Metabolismo Mineral (SEIOMM) para asistir al 30º Congreso de la Sociedad Americana de Investigación Mineral y Ósea (ASBMR). Montreal (Québec, Canada), Septiembre de 2008.
- Premio al Joven Investigador de 2008 otorgado por los moderadores de las sesiones de comunicaciones orales y pósters y el Comité Científico del XIII Congreso de la SEIOMM. Oviedo, Noviembre de 2008.
- Beca de viaje para asistir al XXXVI Congreso de la Sociedad Europea de Tejidos Calcificados (ECTS) en Viena (Austria), Mayo de 2009. El trabajo enviado fue elegido como uno de los que mayor puntuación obtuvo por parte del Comité Directivo del Congreso.

- Beca de viaje otorgada por la SEIOMM para asistir al 31º Congreso de la ASBMR en Denver (Colorado, EEUU), Septiembre de 2009.
- Beca otorgada por la Fundación Europea de Ciencia (ESF) para asistir al Simposio sobre Células Madre del Hueso, en Bertinoro (Forly, Italia), Octubre de 2009.
- Premio al Joven Investigador 2010 (compartido con Ana López Herradón) otorgado por el Comité Científico del XXXVII Congreso de la ECTS. Glasgow, Junio de 2010.

8.3 Otros méritos

- Patente en trámite. Título: Cerámicas bioactivas para liberación local y controlada de PTHrP (107-111).

8.4 Congresos internacionales

- **Lozano D**, de Castro LF, Leandro LJ, Villanueva-Peñacarrillo ML, Esbrit P, Álvarez-Arroyo MV. High glucose decreases osteoblastic growth and function through the VEGF/VEGFR-2 system. Presentado como poster en el XIX Congreso Mundial de Diabetes en Diciembre de 2006 en Sudáfrica. [*Diabetic Med (J Diabetes UK)* 23: 280, 2006].
- **Lozano D**, de Castro LF, Gómez-Barrena E, Manzarbeitia F, Gómez S, Alvarez-Arroyo MV, Esbrit P. Role of parathyroid hormone-related protein and vascular endotelial growth factor on the decreased osteoblast function associated with diabetic osteopenia. Presentado como poster en el XXXIV Congreso de la ECTS de 2007 en Copenhague. [*Calcif Tissue Int* 80: s41, 2007].
- Nuche-Berenguer B, Sancho V, Cancelas J, **Lozano D**, Esbrit P, Villanueva-Peñacarrillo ML. GLP-1 Action on Bone Turnover in Normal and Type 2 Diabetic State. Presentado como poster en Septiembre de 2007 en el XXIX Congreso de la ASBMR en Honolulu. [*J Bone Miner Res* 22: S244, 2007].

- **Lozano D**, de Castro LF, Gómez-Barrena E, Manzarbeitia F, Esbrit P. Osteogenic effects of parathyroid hormone related protein (pthr) (1-36) in a diabetes mellitus model in mice. Presentado como comunicación oral en Madrid en Abril de 2008 en el XVII Congreso de la EORS. Seleccionada como una de las cinco mejores comunicaciones presentadas al Congreso y galardonada con el EORS Award 2008 como la mejor comunicación presentada.
- **Lozano D**, Esbrit P, Salinas AJ, Doadrio JC, Vallet-Regí M, Gómez-Barrena E. Mesoporous bioceramics coated with PTHrP (107-111) stimulates osteoblastic function in vitro. Presentado como comunicación oral en Madrid en Abril de 2008 en el XVII Congreso de la EORS.
- **Lozano D**, de Castro LF, Gómez-Barrena E, Manzarbeitia F, Esbrit P. Osteogenic effects of both n- and c-terminal parathyroid hormone-related protein fragments in an experimental model of regenerating bone in diabetic mice. Presentado como póster en el XXXV Congreso de la ECTS de 2008 en Barcelona. [*Calcif Tissue Int* 82: S110, 2008].
- de Castro LF, **Lozano D**, Gómez-Barrena E, Manzarbeitia F, Esbrit P. Both N- and C-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) reverse the catabolic effects of 3-methylprednisolone on bone regeneration in mice. Presentado como comunicación oral en el XXXV Congreso de la ECTS de 2008 en Barcelona. [*Calcif Tissue Int* 82: S45, 2008].
- **Lozano D**, Esbrit P, Salinas AJ, Doadrio JC, Vallet-Regí M, Gómez-Barrena E. SBA-15 mesoporous bioceramic functionalized and loaded with PTHrP (107–111): biological effects in osteoblasts. Presentado como poster en Amsterdam en Junio de 2008 en el VIII Congreso Mundial de Biomateriales.
- **Lozano D**, de Castro LF, Gómez-Barrena E, Dapia S, Manzarbeitia F, Esbrit P. The C-terminal fragment of parathyroid hormone-related protein, PTHrP (107-139), exerts osteogenic features in both regenerating and nonregenerating bone in mice with diabetes-related osteopenia. Presentado como poster en Montreal en Septiembre de 2008 en el XXX Congreso de la ASBMR. [*J Bone Miner Res* 23: S176, 2009].
- de Castro LF, **Lozano D**, Gómez-Barrena E, Dapia S, Esbrit P. The N-terminal fragment of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) promotes the

glucocorticoid-related deficiency of bone regeneration after bone marrow ablation in mice. Presentado como poster en Montreal en Septiembre de 2008 en el XXX Congreso de la ASBMR. [*J Bone Miner Res* 23: S176, 2009].

- **Lozano D.**, Portal-Núñez S., de Castro L.F., Andrade-Zapata I., Dapía S., Esbrit P. The C-terminal fragment of parathyroid hormone-related protein counteracts the deficient osteogenesis in the bone marrow of diabetic mice. Presentado como poster en Mayo de 2009 en Viena en el XXXVICongreso de la ECTS en Viena [*Bone* 44: s355, 2009].
- **Lozano D**, Andrade-Zapata I, de Castro LF, de Gortazar AR, Portal-Núñez S, Esbrit P. PCRarray analysis reveal alterations in the diabetic bone which are differently affected by administration of the N- and N-terminal domains of parathyroid hormone-related protein in mice. Presentado como poster en Mayo de 2009 en Viena en el XXXVI Congreso de la ECTS. [*Bone* 44: s360, 2009]
- Gómez Gil V, Trejo C, Garcia-Honduvilla N, **Lozano D**, Bellido M, Doadrio JC, Salinas AJ, Esbrit P, Gómez Barrena E, Vallet Regí M, Buján J. Mimetic biomaterials in compromised bone repair: PTHrP peptide (107-111)-releasing silica mesoporous biomaterial improves bone neoformation in an experimental model of osteoporosis. Presentado cómo poster en Lausanne en septiembre de 2009 en la XXII Conferencia Europea de Biomateriales.
- de Castro LF, **Lozano D**, Dapía D, Portal-Núñez S, Esbrit P. Comparison of the skeletal effects induced by daily administration of PTHrP (1-36) and PTHrP (107-139) to ovariectomized mice. Presentado cómo poster en Denver (Colorado, EEUU) en Septiembre de 2009 en el XXXI Congreso de la ASBMR.
- **Lozano D**, Trejo CG, Salinas AJ, Dapía S, Buján J, Vallet-Regí M, Esbrit P, Gómez-Barrena E. PTHrP (107-111) Loaded Into Mesoporous Bioceramics Improves Bone Regeneration Following A Cavitary Defect In Rabbits. Presentado cómo póster en Denver (Colorado, EEUU) en Septiembre de 2009 en el XXXI Congreso de la ASBMR.
- **Lozano D.**, Portal-Núñez S., de Castro L.F., Gómez-Barrena E., Esbrit P. Both N- and C-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein restore the altered osteogenic differentiation induced by high glucose in mesenchymal cells from the mouse bone marrow. Presentado como comunicación oral en

Bertinoro (Forlì, Italia) en octubre de 2009 en el para asistir al primer Simposio sobre Células Madre del Hueso, en Bertinoro (Forlì, Italia), Octubre de 2009.

- López-Herradón A, **Lozano D**, Portal-Núñez S, de Castro LF, Esbrit P. Both N- and C-terminal fragments of Parathyroid hormone-related protein counteracts the inhibition of the Wnt/ β -catenin pathway in mice with diabetes-related osteopenia. Será presentado como comunicación oral en Junio de 2010 en el XXXVII Congreso de la ECTS.

8.5 Congresos nacionales

- **Lozano D**, de Castro LF, Esbrit P, Gómez S, Álvarez-Arroyo MV. Papel de la proteína relacionada con la parathormona y el factor de crecimiento del endotelio vascular en la pérdida de masa ósea asociada a la diabetes, Presentado como poster en el XII Congreso de la SEIOMM en Noviembre de 2006. [*Rev Esp Enf Metab Óseas (REEMO)* 15: 121, 2006].
- **Lozano D**, de Castro LF, Gómez Barrena E, Manzarbeitia F, Esbrit P. Efectos osteogénicos de la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) (1-36) en un modelo de diabetes mellitus experimental en ratón. Presentado como poster en octubre de 2007 en el XII Congreso de la SEIOMM. [*Rev Esp Enf Metab Óseas (REEMO)* 16:101, 2007].
- de Castro LF, **Lozano D**, Gómez-Barrena E, Manzarbeitia F, Mariñoso ML, Gómez S, Esbrit P. Efecto de la dexametasona sobre la regeneración ósea tras la ablación medular en la tibia de ratón. Presentado como poster en octubre de 2007 en el XII Congreso de la SEIOMM. [*Rev Esp Enf Metab Óseas (REEMO)* 16: 102, 2007].
- Nuche-Berenguer B, Cancelas J, Sancho V, Arnés L, **Lozano D**, Esbrit P, Villanueva-Peñacarrillo ML. El péptido similar al glucagón (GLP)-1 ejerce efectos sobre el remodelado óseo en ratas normales y con diabetes tipo 2. Presentado como poster en octubre de 2007 en el XII Congreso de la SEIOMM. [*Rev Esp Enf Metab Óseas (REEMO)* 16: 103, 2007].

- **Lozano D**, de Castro LF, Andrade-Zapata I, Gómez Barrena E, Dapía S, Esbrit P. Efectos de la proteína relacionada con la parathormona sobre el crecimiento y la diferenciación de los osteoprogenitores de la médula ósea en el ratón diabético. Presentado como comunicación oral en Oviedo en Noviembre de 2008 en el XIII Congreso de la SEIOMM. Premio al mejor Joven Investigador de 2008 otorgado por los moderadores de las sesiones de comunicaciones orales y poster y el Comité Científico del XIII Congreso de la SEIOMM. [*Rev Esp Enf Metab Óseas (REEMO)* 17: 117, 2008].
- de Castro LF, **Lozano D**, Andrade-Zapata I, Gómez-Barrena E, Dapía S, Esbrit P. La proteína relacionada con la parathormona revierte los efectos catabólicos óseos de la 3-metilprednisolona en el ratón. Presentado como comunicación oral en Oviedo en Noviembre de 2008 en el XIII Congreso de la SEIOMM [*Rev Esp Enf Metab Óseas (REEMO)* 17: 117, 2008].
- Andrade-Zapata I, **Lozano D**, de Castro LF, Esbrit P. Efecto protector de la proteína relacionada con la parathormona N- y C-terminal sobre la disminución de la viabilidad osteoblástica provocada por la elevada glucosa. Presentado como comunicación oral en Oviedo en Noviembre de 2008 en el XIII Congreso de la SEIOMM [*Rev Esp Enf Metab Óseas (REEMO)* 17:117, 2008].
- Trejo CJ, Gómez E, Salinas A, **Lozano D**, Doadrio JC, Buján J, Vallet-Regí M. SBA-15 funcionalizado con PTHrP y C8. Un biomaterial activo en la reparación ósea. Presentado como comunicación oral en Barcelona en Septiembre de 2008 en el Congreso Anual de la Sociedad Ibérica de Biomecánica y Biomateriales.
- **Lozano D**, Trejo CJ, Salinas AJ, Dapía S, Buján J, Vallet-Regí M, Esbrit P, Gómez-Barrena E. La PTHrP (107-111) (osteostatina) cargada en biocerámicas mesoporosas promueve la regeneración ósea tras un defecto cavitario en conejo. Presentado como comunicación oral en Octubre de 2009 en Santander en el XIV Congreso de la SEIOMM [*Rev Mult Gerontol* 19: 9-18, 2009].